

國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics

College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Master Thesis

研發一免標定全血處理之微流道晶片

進行血漿純化和白血球捕捉

Developing a label-free whole-blood processing microfluidic
device for plasma collection and white blood cells trapping

蘇威宇

Wei-Yu Su

指導教授：黃念祖 博士

Advisor: Nien-Tsu Huang, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



研發一免標定全血處理之微流道晶片進行血漿純化
和白血球捕捉

Developing a label-free whole-blood processing
microfluidic device for plasma collection and white
blood cells trapping

本論文係蘇威宇君（學號 R04945031）在國立臺灣大學生醫
電子與資訊學研究所完成之碩士學位論文，於民國 106 年 7 月 26
日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

黃念祖

（指導教授）

黃奕銘

林政廷

許聿翔

所長：

莊曜亨

誌謝




本論文的完成，也代表我碩士生涯的結束，這一路上說順利也不是很順利，其中大大小小的挫折及失敗讓我徬徨，但很感謝許多貴人的幫助讓我能繼續向前進。

首先最感謝的當然是當初收我當學生的指導教授黃念祖老師，願意收留一個在大學成績不甚良好，也沒做過專題的我，令我感到萬分感激。在念祖老師的教導下，在研究上學習如何建立思考邏輯、如何思考批判性的問題、如何有條有序表現出好的報告等。在實驗上學習如何設計好的實驗、如何收取品質良好的實驗結果及數據、如何從失敗的實驗中學習並設計新的實驗等。這些對於從未涉略研究的我來說是頗辛苦的，但這也是令我成長很多的良藥。除此之外，在生活上，念祖老師對我們像是對待自己的兒女一樣，時常關心實驗室的大家，不論是研究上的卡關，或是生活上大大小小的問題都是，在未來的人生規劃更是提供了不少資源及建議，甚至還會跟大家一起出遊玩樂，這是其他實驗室的學生所感受不到的，碩士生涯能遇到這樣的指導教授十分幸運，再次萬分地感謝。

另外要感謝台大電子所的林致廷老師，提供實驗設備及化學試劑，在製程上也給予很多幫助，使我的實驗得以順利進行，在會議上也常常給予不同角度的指導及報告上的鼓勵；感謝台大醫院李任光醫師以及林曉萍學姐提供血液樣本的取得途徑，並給予處理血液上的相關知識及經驗，對於實驗上有相當大的幫助；感謝口試委員林致廷老師、董奕鍾老師、許聿翔老師，謝謝您們願意擔任口試委員，並且在口試中針對研究上的不足以及盲點給予指導建議，使本論文得已完成。

在此還要感謝學長姐、同學、學弟妹們的幫忙，感謝義舜學長在一開始就很有耐心的帶我學習各式各樣的基礎及實驗，在之後的製程及實驗上也幫助了我解決



不少問題，並且在未來的人生規劃更是給予了很多的方向及建議；感謝柏翰學長在我製程卡關時給予經驗上的建議，在製程上給予很大的幫助；感謝俊叡學長及筌凱學長在忙著畢業之際還願意教導剛進實驗室的我一些實驗及報告上的建議；感謝楊昇學長在製程上一路帶著我學習到熟練為止；感謝柏承學長、郁欣學姐帶領我瞭解明達 702 的生活，並給予我很多課業及研究上的建議；感謝實驗室的好同學舒鴻、郁蓁、冠宏陪伴我碩士的兩年生涯，一起玩樂、一起打拼；感謝所上的好友則言、健庭，陪伴我平時的舒壓及討論各種未來的規劃；感謝實驗室的學弟妹凱歲、怡穎、聖翰、琪蓁、Hana 總是幫我解決了實驗上的各種疑難雜症，並且幫助了我在報告上邏輯以及英文不好的問題；最後最感謝的是大涵，從一開始領我進門學習各種的實驗儀器及電腦軟體、碩論方向的成型、實驗上的設計、以及最後整個碩論的完成，都多虧了大涵的督促及指導。

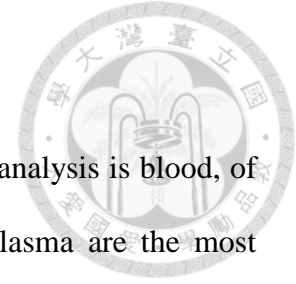
最後要感謝我最敬愛的爸爸及媽媽，謝謝您們一直以來無怨無悔的教養之恩，更感謝您們從高中以來就相信我並支持我的決定，沒有您們就不會有現在的蘇威宇，希望在未來，能盡我一輩子來報答您們；也要感謝老弟，讓我有一個能無話不談的人。最後再次感謝幫助過我的所有人，沒有你們，本研究就無法完成，僅此獻上本論文以茲感謝。

中文摘要



血液是現今最常被用來分析各式各樣人體訊息的生物樣本，其中常見的分析目標為紅血球、白血球以及血漿。為了要準確地得到這些訊息，必須將血液樣本中的各內容物進行前處理如：分離或稀釋。本論文設計一被動式分離全血微流道晶片，僅需使用少量的血液樣本($<10\mu\text{L}$)，無需血球標記的前處理，同時進行全血的血漿分離純化(稀釋 1.3 至 2.5 倍)與紅、白血球的分離，並且 30 分鐘內以微柱陣列捕捉約 3000 顆白血球。目前此全血處理微流道晶片在分析目標上已有初步成果，且具有將全血細胞計數(Complete Blood Count, CBC)發展成實驗室晶片(Lab-on-a-Chip, LOC)之潛力。

ABSTRACT



Nowadays, one of the most commonly used sample for health analysis is blood, of which red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs), and plasma are the most commonly used analytes. For direct analysis of blood, the samples should be pre-processed through separation or dilution. In this thesis, we designed a passive whole blood separation microfluidic device that can simultaneously separate plasma (with 2.2-2.5 times dilution) and WBCs from whole blood. The device can further trap about 3000 WBCs with micro-pillars in 30 minutes. The separation process is label-free and requires a low sample volume of 10 μ L. The whole blood separation microfluidic device has the potential to achieve complete blood count (CBC) and develop into a Lab-on-a-Chip (LOC) device.

目錄



口試委員會審定書	#
誌謝	ii
中文摘要	iv
ABSTRACT	v
目錄	vi
第 1 章 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 文獻回顧.....	2
1.2.1 從全血分離血漿.....	3
1.2.2 從全血分離白血球.....	8
1.2.3 白血球或罕見細胞之捕捉.....	13
1.3 研究動機以及目的.....	14
1.4 論文架構.....	14
第 2 章 基本理論.....	16
2.1 分岔定律.....	16
2.2 血液分離流道原理與微流道晶片設計.....	18
第 3 章 實驗流程.....	23
3.1 晶片製程.....	23
3.1.1 光微影模具製程流程.....	24
3.1.2 光微影製程之參數設定.....	28



3.1.3	軟微影製程.....	30
3.1.4	微流道晶片之填充微珠製程.....	33
3.2	血液樣本處理.....	33
3.2.1	血液樣本取得.....	33
3.2.2	吸光度量測血漿稀釋倍率.....	34
3.2.3	白血球染色.....	35
3.2.4	血球計數.....	35
3.3	微流道實驗.....	36
3.3.1	血漿純化實驗.....	36
3.3.2	使用 2 μ m 及 10 μ m 微珠模擬分離紅、白血球實驗.....	37
3.3.3	白血球捕捉實驗.....	38
3.3.4	使用 4.5 及 10 μ m 微珠模擬不同尺寸的細胞捕捉實驗.....	39
第 4 章	實驗結果與討論.....	41
4.1	微流道製作結果與量測.....	41
4.2	2 μ m 及 10 μ m 微珠模擬紅、白血球分離結果.....	42
4.3	純化血漿結果與稀釋倍率量測.....	42
4.4	全血分離紅血球結果.....	44
4.5	使用微柱結構捕捉白血球.....	46
4.5.1	之字形捕捉區域捕捉白血球.....	46
4.5.2	圓形捕捉區域捕捉白血球.....	48
4.6	圓形微柱捕捉不同尺寸之微珠.....	51
第 5 章	結論與未來展望.....	53

5.1	結論.....	53
5.2	未來展望.....	53



圖目錄



圖 1-1	不同的血漿分離方式[15].....	4
圖 1-2	整合無幫浦之血球沉降微流道晶片[16].....	5
圖 1-3	整合無幫浦之血球濾膜微流道晶片[17].....	6
圖 1-4	逆向式血漿純化微流道系統[18].....	7
圖 1-5	CD 離心式血漿分離微流道晶片[19].....	7
圖 1-6	結合特製微量吸管(smart pipette)之分離血漿微流道系統[20]	8
圖 1-7	慣性流(Inertial flow)示意圖[26]	9
圖 1-8	慣性流微流道晶片[29, 31].....	10
圖 1-9	連續彎曲橫向流微流道晶片[33, 35].....	11
圖 1-10	鞘流分離微流道晶片[36, 37].....	12
圖 1-11	其他被動式血球分離微流道[38-40]	12
圖 1-12	微柱結構捕捉細胞[44, 45].....	13
圖 1-13	血液處理流程圖[46].....	14
圖 2-1	分岔定律示意圖[47].....	17
圖 2-2	鞘流分離血球示意圖[49].....	19
圖 2-3	60 度夾角之橫向流微流道晶片[50].....	19
圖 2-4	微珠填充流道示意圖[51].....	20
圖 2-5	之字形捕捉微流道設計示意圖。(A) 之字形捕捉微流道示意圖(B)血漿 分離流道及血球分離流道示意圖 (C) 之字形捕捉流道之捕捉微柱影像	21
圖 2-6	圓形捕捉微流道設計示意圖。(A)圓形捕捉微流道示意圖(B)圓形捕捉流	

	道之捕捉微柱影像	22
圖 3-1	光微影製程簡化流程圖 (A)將矽晶圓上的的雜質及氧化層去掉(B)在矽晶圓上塗佈 SU-8 負光阻(C)進行光罩圖案的曝光(D)將未受到曝光之其餘光阻去掉，完成微流道模具(E)在微流道模具上倒入 PDMS 溶劑並使之固化(F)翻模實際 PDMS 微流道晶片	23
圖 3-2	超音波震洗機(E120H, ELMA).....	24
圖 3-3	旋轉塗佈機(AGS1006T)	26
圖 3-4	曝光機(EVG620)	27
圖 3-5	塗佈厚度與轉速對照圖	29
圖 3-6	氧電漿機 (PDC-001, Harrick plasma).....	32
圖 3-7	細胞計數盤	36
圖 4-1	細部結構之顯微鏡影像	41
圖 4-2	微流道模擬分離血液之微珠影像(A) RO 收集之 2 μ m 微珠影像圖(B)白血球捕捉區域之 10 μ m 微珠影像圖	42
圖 4-3	微珠填充流道純化之血漿以及其控制組影像(黑色箭頭表示紅血球細胞，紅色箭頭表示血小板或破裂紅血球)，(A)全血稀釋 1000 倍並靜置於室溫 30 分鐘 (B)全血稀釋 1000 倍並用 vortex 攪拌後靜置於室溫 30 分鐘 (C)微珠填充流道純化之血漿影像	43
圖 4-4	微珠填充流道分離血漿實驗結果。(A)樣本 1 之血漿手動稀釋檢量線(B)樣本 1 之微流道分離稀釋血漿結果(C)樣本 2 之血漿手動稀釋檢量線(D)樣本 2 之微流道分離稀釋血漿結果	44
圖 4-5	全血處理微流道晶片出入口示意圖	45

圖 4-6	三個出口所收集之血球影像，分別為(A)PO、(B)RO(100倍稀釋)、(C)WO， 圖中黑色箭號標示處為白血球	45
圖 4-7	白血球在分離流道累積形成堵塞	46
圖 4-8	之字形捕捉區域捕捉情形	47
圖 4-9	之字形捕捉區域流入血液樣本體積與白血球計數	48
圖 4-10	白血球堵塞影像	48
圖 4-11	圓形捕捉區域捕捉情形	50
圖 4-12	圓形捕捉區域流入血液樣本體積與白血球計數	51
圖 4-13	圓形捕捉區域捕捉(A)4.5 μ m 微珠(B)10 μ m 微珠(C)4.5 μ m 及 10 μ m 微珠。	52




第 1 章 緒論



1.1 研究背景

血液是一種在人體中循環流動的液體組織，大約佔人體重量的 1/13，由 45% 的血球以及 55% 的血漿所組成，其中血球包含：紅血球(Red Blood Cell, RBC)、白血球(White Blood Cell, WBC)、血小板(Platelet)；血漿(Plasma)內則是含有蛋白質、抗體、葡萄糖等代謝產物。血液也可以說是提供身體訊息的資料庫，主要負責氧氣及營養物質的輸送，因此當人體本身產生任何異狀，血液中的內容物會有最直接的變化，如：檢測紅血球中的血紅素與醣化血紅素的比率可以得知是否有糖尿病、計算白血球的數量及種類比例來反映發炎感染的程度等。

全血細胞計數(Complete Blood Count, CBC)是現今醫學領域最為常見之血液檢驗項目，主要為紅血球、白血球、血小板的計數，根據其數量能提供關於人體健康的總體資訊，也能因為數量的驟高或驟降，對一些疾病有初步的判斷，如：白血病。以目前的技術還沒有辦法從人體中抽出的全血樣本直接進行 CBC，必須透過前處理的步驟才能有進一步的分析，如：稀釋、分離等。為了能夠精準的分析血液中的資訊，在傳統上是以檯式(Bench Top)的方式進行 CBC 檢測，以離心機將全血樣本分層後取出，再根據欲計數之血球種類進行手動稀釋或裂解的步驟，最後將處理完之樣本放上細胞計數盤進行人工計數。以傳統的方式進行 CBC 操作較為簡單、技術要求低，但是整個樣本處理的過程及人工計數耗費較多時間，且為了配合大型儀器，通常需要使用較多的樣本體積(>1mL)，對於血液量較少的新生兒來說相當不適合。



全自動血液分析儀(Automated Blood analyzer)，為目前常被用於 CBC 檢測的精密儀器，透過不同尺寸的細胞通過浸泡在電解液之孔洞，量測細胞經過孔洞時的阻抗變化，藉此計數不同種類的細胞，相較於傳統檯式的方式，全自動血液分析儀使用較少量的血液樣本(20-40 μ L)達到數分鐘內的快速計數，此外，全自動血液分析儀結合了光學系統，能進一步的將不同種類白血球分類。然而，全自動血液分析儀仍然屬於昂貴的儀器，只適用於學校、醫院等地方，且其利用阻抗的變化來進行細胞計數，此方式需要高稀釋倍率的血液樣本，才能避免誤差。

近年來，由於醫療檢測技術的進步，以及居家遠端照護的概念日漸成熟，可攜帶式的定點醫療檢測系統為目前相當熱門的研究方向。因此本論文提出一全血處理微流道晶片，期望藉由微流道製作簡易、體積小、成本低特性，將 CBC 檢測的概念發展到實驗室晶片(Lab-on a Chip, LOC)上。

1.2 文獻回顧

微流道系統(microfluidics system)，屬於微機電製程(Micro Electro Mechanical System)延伸到生醫領域的一種應用，藉由在微小的晶片上做出微米等級的結構如：通道、反應槽、閥門、幫浦等，達到精準的流體控制，並應用於生醫實驗中[1-4]。在傳統上操控流體反應不僅需要大型儀器以及其複雜的操作流程，在儀器本身及耗材的成本上亦有較為昂貴的花費。相較之下，微流道系統將這些功能元件微型化，並整合在一製作成本低廉的微小晶片上，使流程簡化、成本下降，並體現所謂實驗室晶片(Lab-on-a-chip, LOC)的理念[5]。除此之外，與傳統儀器所具有之功能相比，微流道系統更有以下優勢：(1)具有較高的表面積-體積比(surface-to-volume-ratio)，增加了生化反應的接觸面積，且其較短的擴散長度(diffusion length)亦明顯地縮短了操作時間。(2)由於微流道晶片本身製作成本較為低廉，且體積小，可以和各式各

樣的檢測系統進行整合，如 LSPR[6]、奈米線感測器[7-9]、EIS 感測器[10]等。(3) 微流道晶片具有可拋棄式的特性，適合發展成定點照護(point-of-care, POC)的檢測方式。



1.2.1 從全血分離血漿

近年來已經有不少的研究團隊將微流道應用於血漿萃取的領域[11-14]。Kersaudy-Kerhoasa and Sollierb[15]兩人將微流道對於血漿萃取的應用分類成有額外的場域以及沒有額外場域兩種方式。有額外場域的血漿萃取微流道主要依靠外加力場的作用，而不依靠粒子本身的物理性質，可分為聲波、電力、磁力的場域等，對於血球的方向控制以及過濾有較高的控制能力，但其有微小化不易以及成本高等缺點；沒有額外場域的血漿萃取微流道則是依靠粒子本身的大小、重量、形狀、本身的物理性質而設計的獨特流道，具有晶片製作簡單、易於微型化和低成本的優勢但其所需時間較長，主要分為沉降，過濾，粒子偏移三種方法，如圖 1-1 所示。本論文選擇採用無額外力場的方法，期望實現系統整合的目的優勢。以下將對現有無額外力場之微流道晶片研究做一詳細的介紹。

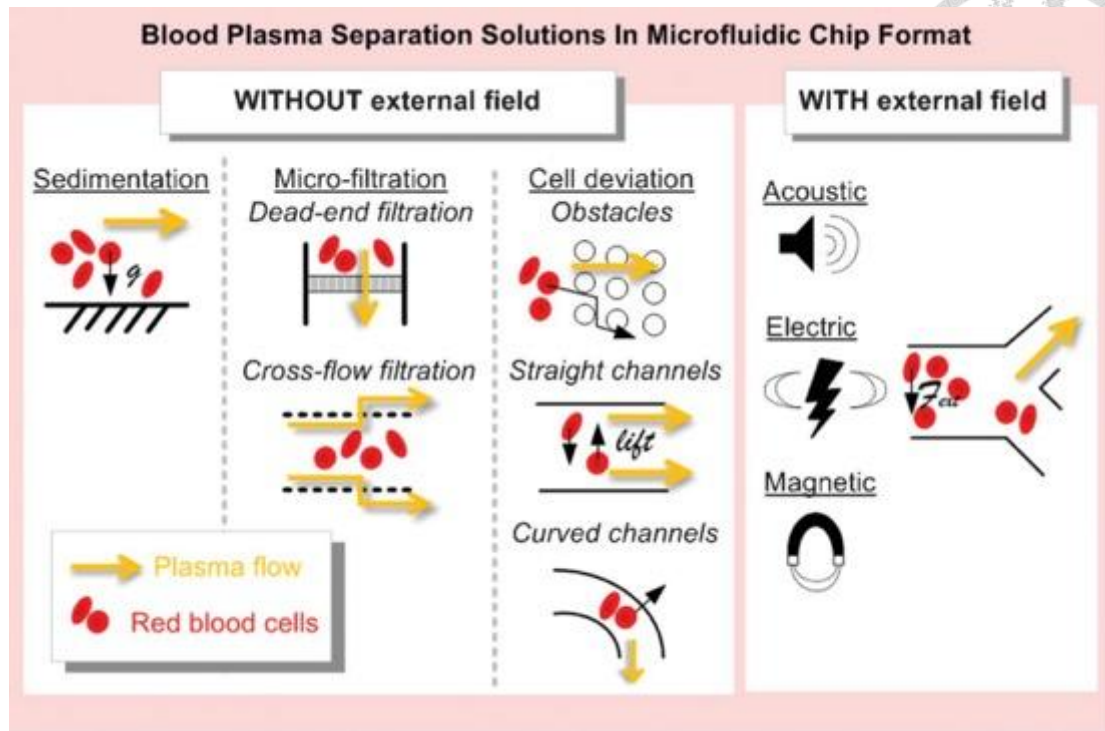


圖 1-1 不同的血漿分離方式[15]

加州大學柏克萊分校的 Lee[16, 17]教授研究團隊研發兩種不需要幫浦的整合式微流道血液分析系統，一種為利用血球本身因重力會沈降的原理，當血液流入流道之後血球會沈降在過濾槽中並分離出血漿(圖 1-2)；另一種則是在流道上游的頂端加了一層濾膜，當血液由下方入口進入流道上游後，藉由血球本身的重力沈降，使濾膜不會被堵塞的情況下分離出血漿(圖 1-3)。這兩種微流道設計皆直接使用流體壓力差的方式注入血液樣本，不需要其他外加的流體幫浦，降低操作複雜程度，並使之具有成為定點照護(POC)應用的潛力。然而因其使用流體壓力差的方式注入血液樣本，流速並不穩定，壓力差會隨著流入的樣本量減少，造成流速降低，亦無法流入大量的樣本體積。

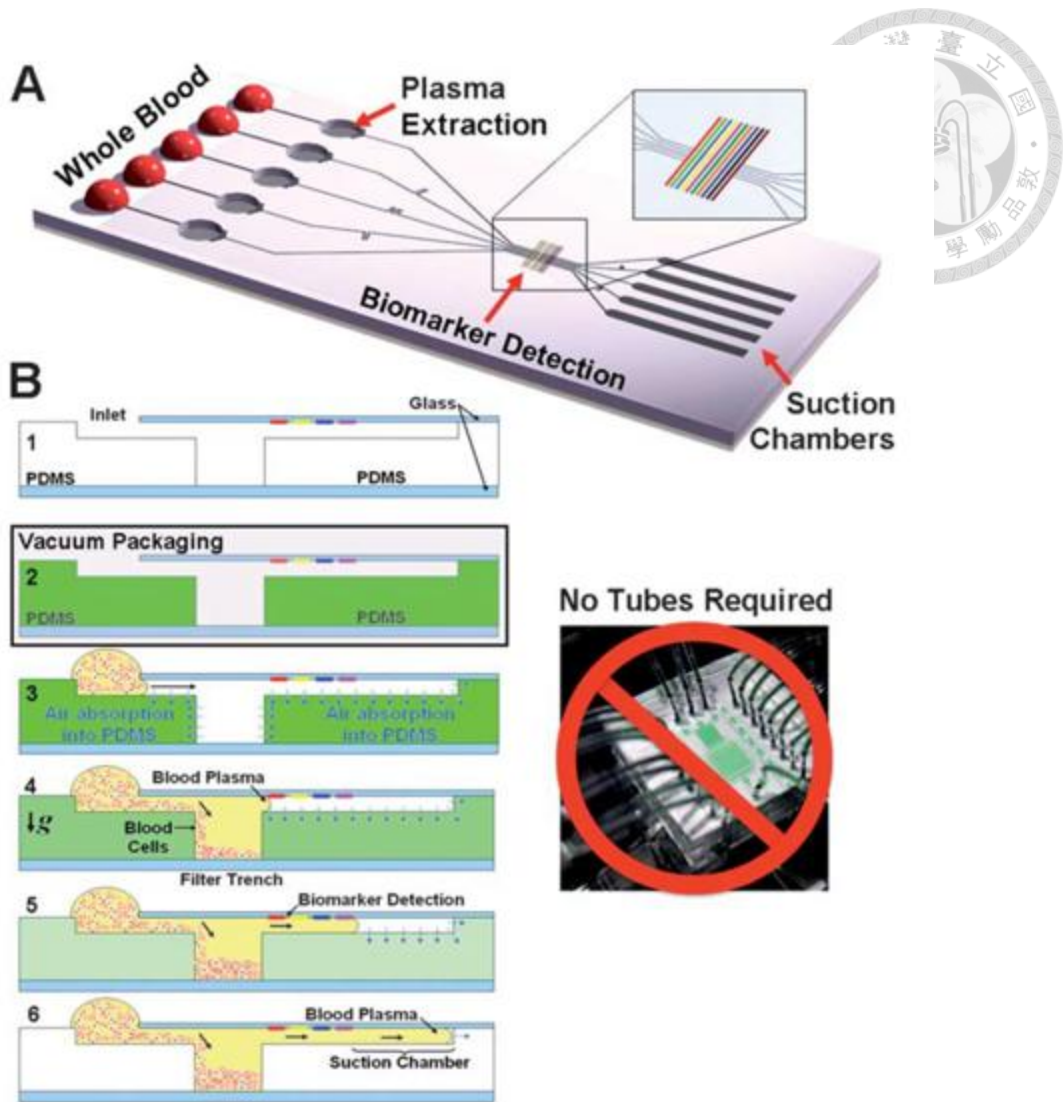


圖 1-2 整合無幫浦之血球沉降微流道晶片[16]

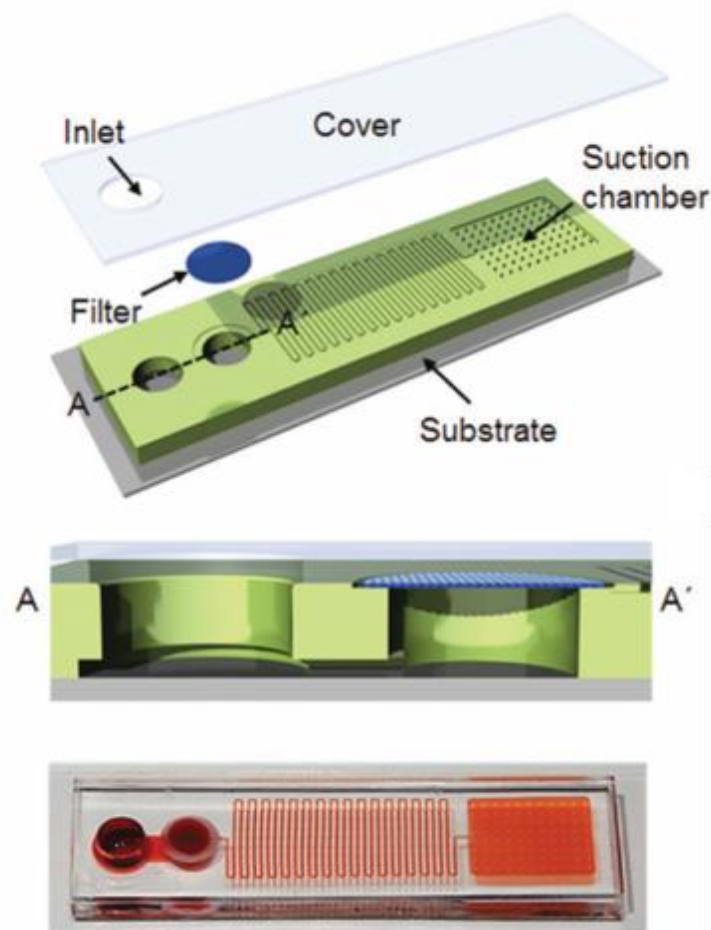


圖 1-3 整合無幫浦之血球濾膜微流道晶片[17]

Achard[13]等人利用細胞在層流中的慣性遷移現象將血球細胞集中在流道中間，而血漿分離在管壁上，並使流道寬度增大，增加血漿在管壁的範圍以提高良率，但血液需稀釋才能產生較好的粒子慣性遷移現象，達到血漿分離的效果，且需將全血稀釋到 20 倍才有較高的血漿純化率。Xia[18](圖 1-4)的團隊提出了利用血球本身的重力沉降使 100~300 μm 微流道中的血球及血漿分層再結合流道伸縮，使得血漿區域擴大，並在 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下得到一個簡單、穩定的全血處理系統，但是由於其三維空間的限制使製程上的難度相對較高。

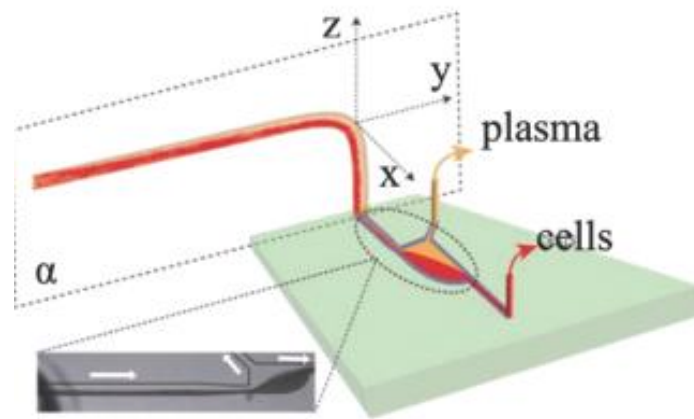


圖 1-4 逆向式血漿純化微流道系統[18]

Stefan Haerberle[19]等人提出一離心 CD 式血漿分離微流道，如圖 1-5 所示，能夠在 20 秒分離出大部分的血漿，且血球在其中所佔的濃度比例相當低，然而其每一流道結構及每個反應槽之容納體積需要非常精準的計算，在設計需求上難度較高。Byeongyeon Kim[20]等人提出一特製之微量吸管(smart pipette)結合血漿分離微流道晶片(圖 1-6)，以微量吸管中的一段空氣作為穩定推進的動力，達到簡便、高純度的血漿分離，但是此微流道設計需要兩段式曝光顯影，且以空氣作為推進力所造成的流速誤差，對於微量等級的血液樣本來說影響極大。

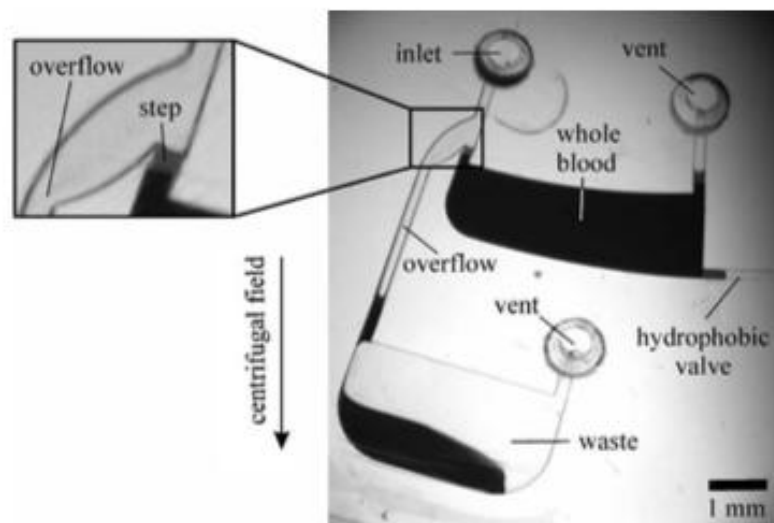


圖 1-5 CD 離心式血漿分離微流道晶片[19]

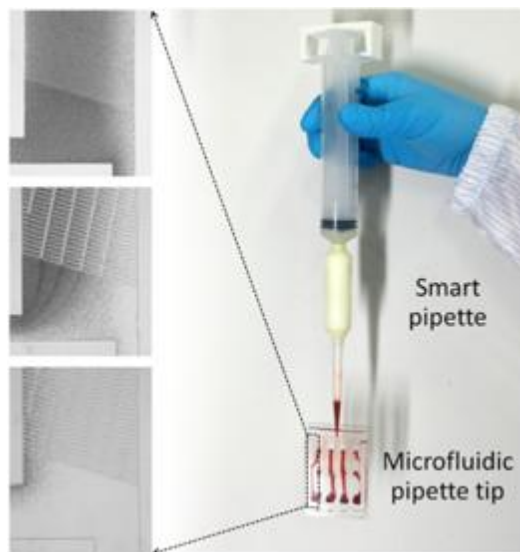


圖 1-6 結合特製微量吸管(smart pipette)之分離血漿微流道系統[20]

1.2.2 從全血分離白血球

另一方面，Andreas Lenshof and Thomas Laurell[21]兩人以及 Ali Asgar S. Bhagat[22]的團隊將微流道分離血球的技術分成主動分離及被動分離技術兩種方式。主動分離技術是利用外加的力場，如磁力[23]、光學[24]、電泳、聲波等，將目標血球從流動的血液中分離出來，對於目標血球的方向以及過濾有較高的控制能力，然而磁珠標記的方式仍需要對分離後的細胞進行磁珠的清洗或分離，對於細胞分析不甚方便;另一方面，用光學光鉗子的方式雖然解決了標記細胞的問題，但是雷射光源過高的能量，很可能造成細胞的死亡、損害。

相較之下，被動分離技術是屬於較不會傷害細胞的一種方式，且其原理簡單，只依靠粒子本身的大小、重量、形狀、本身的物理性質而設計的獨特流道，如：微柱結構、彎曲結構等，進而分離目標細胞[25]。本論文選擇採用被動式分離的方式，期望實現在不傷害細胞且無需標記細胞的情況下將白血球分離出來。以下將詳細介紹幾種常見被動式分離微流道晶片應用於血球分離的原理。其中包含：慣性流(Inertial Flow)、橫向流(Cross Flow)、以及鞘流(Sheath Flow)。

慣性流(Inertial Flow)[26-28]是利用粒子受到流體本身剪應力梯度(shear gradient)以及牆壁效應(Wall Effect)的影響，使得不同大小的血球會在流體中不同的位置達成橫向的力平衡，藉此將不同大小的細胞進行分離，如圖 1-7 所示。

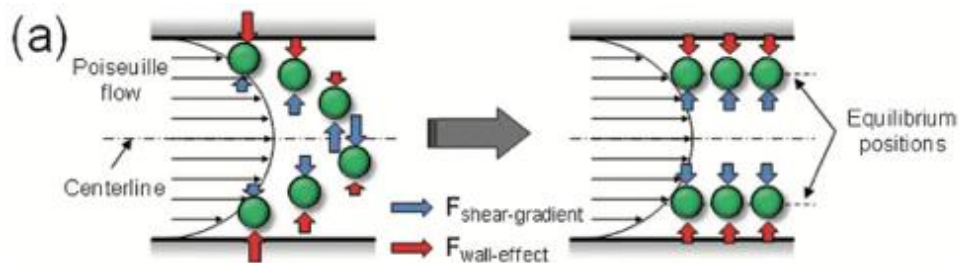


圖 1-7 慣性流(Inertial flow)示意圖[26]

Fan-Gang Tseng[29, 30]的團隊設計一具有彎曲流道之全血處理微流道晶片(圖 1-8(A))，以減少慣性流的流道體積，藉由左右輪流彎曲而使被慣性流推向兩側之紅血球有效地被分離至分支流道中，但是此微流道設計在光微影製程上要兩道曝光顯影的步驟，導致製作品片模具所需要的時間及技術要求較高。Hyung-A Hyun[31]等人的團隊則提出並聯的方式提升分離細胞樣本體積的效率，如圖 1-8(B)所示，在流道前端設計一流道將流入之細胞樣本平均分散至四道流道中，每道流道藉由收縮流道接連的設計結構強化慣性力與牆壁效應的相互作用而分離不同大小的細胞，體積較大的循環腫瘤細胞(Circulating Tumor Cells, CTCs)將平衡在流道的中間，而體積較小顆的白血球則是平衡在流道兩側，藉此達到有效的分離，但該微流道晶片所使用的並非全血樣本，而是經過裂解、分離後的細胞樣本，此外為了有好的分離效率，需要設計較長的流道體積。

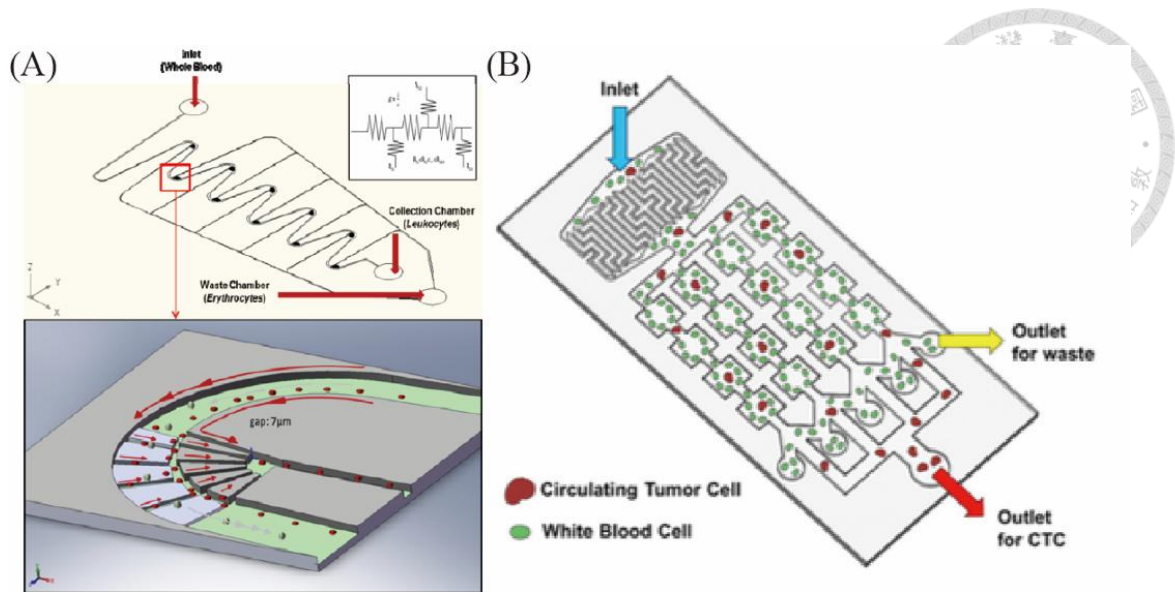


圖 1-8 慣性流微流道晶片[29, 31]

橫向流(Cross Flow)[32]，同樣是利用流體慣性力來分離大顆和小顆的粒子，不同的是，橫向流在流道中建立一排的微小柱子，並利用柱子與柱子之間的距離來分離小顆的粒子，並留下大顆的粒子在主流道，進而達到分離的效果。

Virginia VanDelinder and Alex Groisman 兩人提出一白血球高分離效率之橫向流微流道晶片，藉由將橫向流之流道厚度設計為 $3\mu\text{m}$ ，以紅血球之延伸性足以通過，而白血球則是被留在原流道中，然而此微流道之製程步驟需要兩道曝光顯影程序，需要較長的時間及較繁複的技術。Xing Chen[33, 34]等人的團隊則是提出一利用微柱結構之橫向流微流道晶片，並且以連續彎曲的流道設計來減少長流道晶片的體積，此設計能夠有較高的紅血球分離效率，但其設計之橫向流微柱間距為 $6.5\mu\text{m}$ ，對於白血球來說仍然是足以穿過的大小，因此白血球之分離效率並不甚良好。

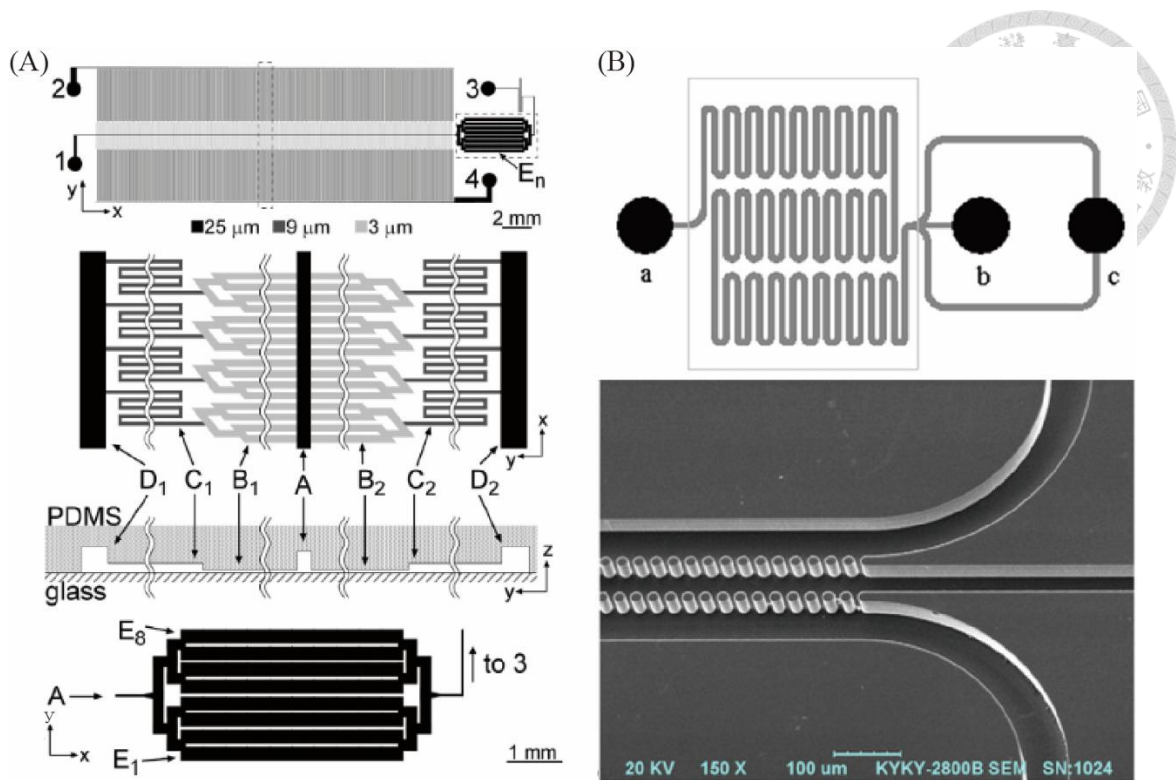


圖 1-9 連續彎曲橫向流微流道晶片[33, 35]

鞘流(Sheath Flow)，是指在微小的尺度下，當兩個來源不同、且流速不同的流體交會時，兩者並不會混合，而是在兩者之間形成分層，併行往下流。由於細胞會順著本身質心在流體中的位置流動，也因此，當體積較小的細胞會因為被側向的鞘流流體推動，使得質心留在樣本流體中，順著樣本流體往下流；另一方面，體積較大的細胞被側向的鞘流流體推動時，會因為體積較大導致質心不會再樣本流體內，而是在鞘流流體內，順著鞘流流體流動。

P.Sajeesh[36]的團隊設計一鞘流微流道，除了可以應用於分離不同大小的細胞，亦能夠以細胞延展性程度的不同來進行分離(圖 1-10(A))。Myung Gwon Lee[37]等人則是提出一個將鞘流與慣性流結合而成一被動式分離微流道(圖 1-10(B))，藉由鞘流與伸縮流道的設計縮短了慣性流所需要之流道長度，提高分離效率，但此設計適用於分離相對於其他血球大很多的癌症細胞，對濃度較高且大小相近的紅血球與白血球是仍有難度的。

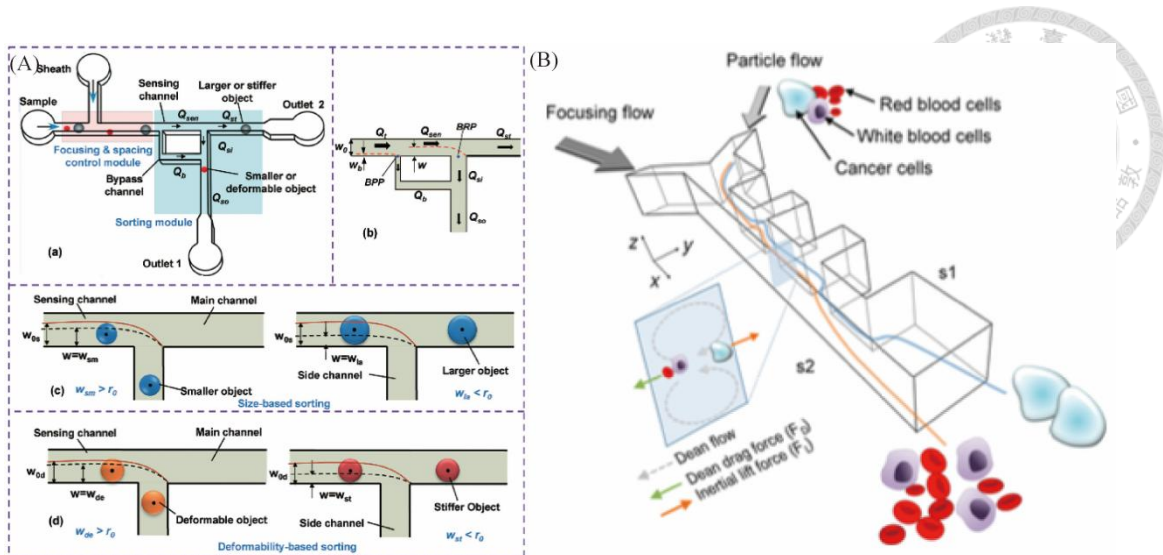


圖 1-10 鞘流分離微流道晶片[36, 37]

除了上述三種常見的分離原理外，仍有不少特殊的被動式分離血液微流道晶片，如圖 1-11 所示，Jongchan Choi[38]等人設計一微柱障礙物微流道使紅血球與白血球的流線產生偏差，進而分離；I. D. Johnston[39]等人則是提出藉由漩渦的流道設計達到類似離心分離的效果；Yousang Yoon[40]的團隊設計了一十字微流道利用一排陣列之微柱將細胞卡住，並藉由流體方向的來回沖洗，讓體積較小的血球細胞通過微柱，而使體積較大的癌症細胞被留在微柱的一側。

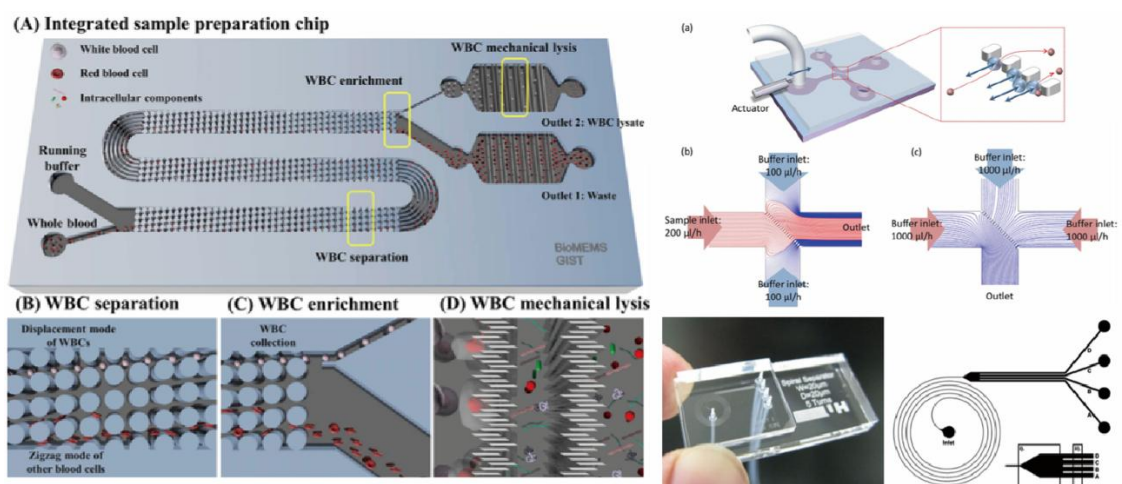


圖 1-11 其他被動式血球分離微流道[38-40]



1.2.3 白血球或罕見細胞之捕捉

除了上述利用持續流體動力將細胞進行分離的方式外，近年來亦有不少研究團隊設計用捕捉槽的方式將目標細胞停留在微流道裡面[41-43]，此方式是利用細胞本身的體積大小的不同進行攔截捕捉，利於捕捉血液樣本中的白血球。Jingdong Chen[44]等人設計一 U 形捕捉微柱之結構將血液中的白血球進行捕捉，如圖 1-12(A)所示，此方式對於被捕捉的白血球可以有快速簡便的數量計算，但是其 U 形捕捉結構為兩層不同形狀之微柱，故在製程上需要較為繁複的曝光顯影步驟。A Fatih Sarioglu[45]等人的團隊則是提出一三角形微柱陣列之捕捉微流道(圖 1-12(B))，用來捕捉兩顆以上為一群之循環腫瘤細胞群，藉由三角形的斜邊控制流體流線，進而有效地捕捉目標細胞，但是三角形陣列之微柱設計對於具有延伸性的單顆細胞，無法進行捕捉。

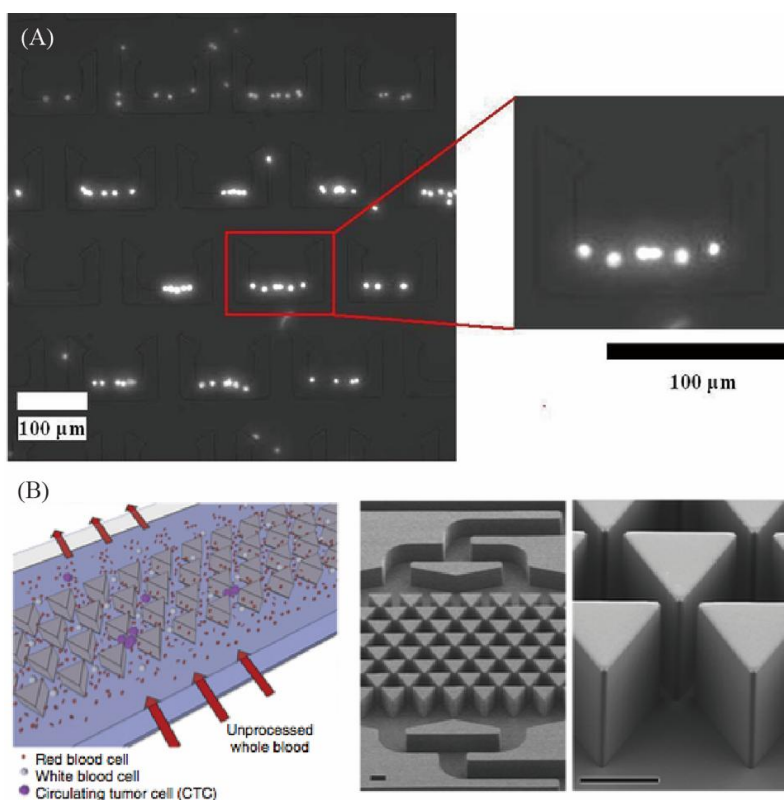


圖 1-12 微柱結構捕捉細胞[44, 45]



1.3 研究動機以及目的

當生物樣本進行標準細胞檢驗時，主要可分為樣品收集、樣品準備及樣品分析三個部分[46]，如圖 1-13 所示。從圖中內上方之圓餅圖可以看到代表三個階段佔全部流程的時間比例，其中在樣品準備的步驟上佔了絕大多數的檢測時間，主要是因為在準備的步驟當中需要繁複的樣品處理步驟以及多種不同功能的檢驗分析儀器。

藉由微流道系統可以整合處理樣品的流程於同一晶片上，大幅減少了樣本處理的時間，並且還具有不需額外的人力操作及低花費成本的優勢。雖然現今大多數應用於血液處理之微流道都能有與傳統全血處理的方式相符的效率，但都僅限於單一功能，也因此未能取代傳統的方式，故本論文欲研發一同時分離血漿、紅血球、白血球之全血樣本處理微流道晶片，並且能將分離後之白血球進行捕捉，使之能應用於樣本分析的步驟上，如：細胞計數、分類等。

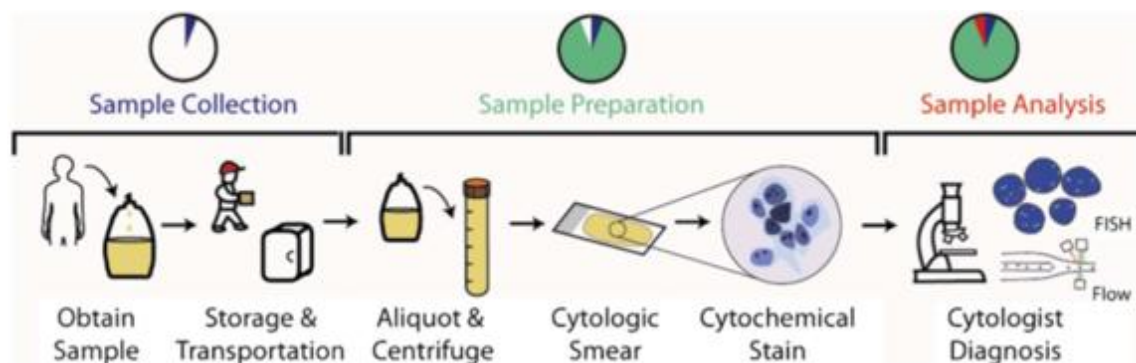



圖 1-13 血液處理流程圖[46]

1.4 論文架構

本論文包含五個章節，第一章為緒論，包含研究背景及動機、文獻回顧、論文架構，首先說明一般並且介紹傳統處理分析血液樣本的方法與現有之血液樣本處



理微流道晶片，並在最後比較各方式的優缺點，選擇本論文適用的方法。第二章為基本理論，首先敘述血液本身在微米尺度下的流動特性，接著說明本論文所選擇分離細胞之流體原理，並在最後依據這些原理詳細說明本論文之全血處理微流道晶片的設計，並進行初步的模擬測試。第三章為實驗流程，包含了矽晶圓模具的光微影製程、微流道晶片的軟微影製程、血液樣本的準備，以及所有微流道實驗的架設及步驟。第四章為實驗結果，首先將說明前一章的微流道晶片的製程結果，接著提出能證明本論文所設計之微流道晶片在全血樣本分離的各項實驗結果，並對所有數據進行說明。最後，第五章為結論與未來展望，將總結本論文之微流道的特色並說明未來的規劃。

第 2 章 基本理論



本論文希望在無需標定血球的情況下，以被動式分離的方式將血漿及血球細胞進行分離，以達到能夠結合後端檢測的期望。本章節將介紹血液中的血球在微米尺度的流場下，所表現之流動趨勢情形，並選擇結合橫向流(Cross Flow)以及鞘流(Sheath Flow)兩種被動式分離血球的方法，加上利用微珠填充流道分離血漿的方式設計一被動式全血處理微流道晶片。

2.1 分岔定律

分岔定律(Bifurcation law / Zweifach–Fung effect) [47]是指紅血球毛細管尺度下的流道時的特殊流動傾向。當紅血球流經分岔區域時，大部分的血球會傾向進入流速較快的分支流道中，而只有少數的紅血球會流向流速較慢的分支流道中，如圖 2-1(a)所示，造成這種傾向的原因是由於當紅血球流到分岔區域時受到較高的壓力梯度($\Delta P_h > \Delta P_l$)，使血球被較高流量的分支流道吸入。除此之外，流體在血球表面上所造成的剪應力($\gamma_{\text{cell_wall_high_flow}} > \gamma_{\text{cell_wall_low_flow}}$)亦不相同，並在細胞上產生扭力，使細胞更容易地流入高流速之分支流道。

另外，由於流量的變化受到管徑(R)、流速(v)以及流線函數 $\psi(r)$ 之影響，可由以下兩方程式所表示[48]：

$$\Delta Q = 2\pi R \cdot v \cdot \Delta R \quad (1)$$

$$\Delta Q = \psi(R + \Delta R) - \psi(R) = \Delta\psi = \frac{\partial\psi}{\partial R} \Delta R \quad (2)$$

其中流量的變化表示為 ΔQ ，v 為流速，R 及 ΔR 則是環形的半徑及其極小的半徑厚度，流量的變化亦可以流線函數 $\psi(r)$ 來表示。結合上述(1)、(2)式，可得到以下流速表示式：



$$v = \frac{1}{2\pi R} \frac{\partial \psi}{\partial R} \quad (3)$$

為了說明當細胞流至分支點時的受力情形，將(3)式帶入以下受力方程式：

$$F_p = 8\mu L \pi \frac{D_c^2}{D_t^2} (v_1 - v_2) \quad (4)$$

其中 μ 為流體之黏滯係數， D_c 為細胞直徑， D_t 為管子直徑， v_1 、 v_2 為兩分支流道之流速。如圖 2-1 所示，這表示在流場中以關鍵流線(圖中虛線處)為基準點，大部分之流線傾向流往流速較快之分支，當血球的重心超出了關鍵流線的位置，血球就會傾向流入高流速的分支流道，也就是說，當兩分支之流速比相差越大時，關鍵流線就會越接近較低流速的分支，血球也更加地傾向流速快地分支流道，而圖中的粒子代表在流場中不同的位置以及其被預測之流向。

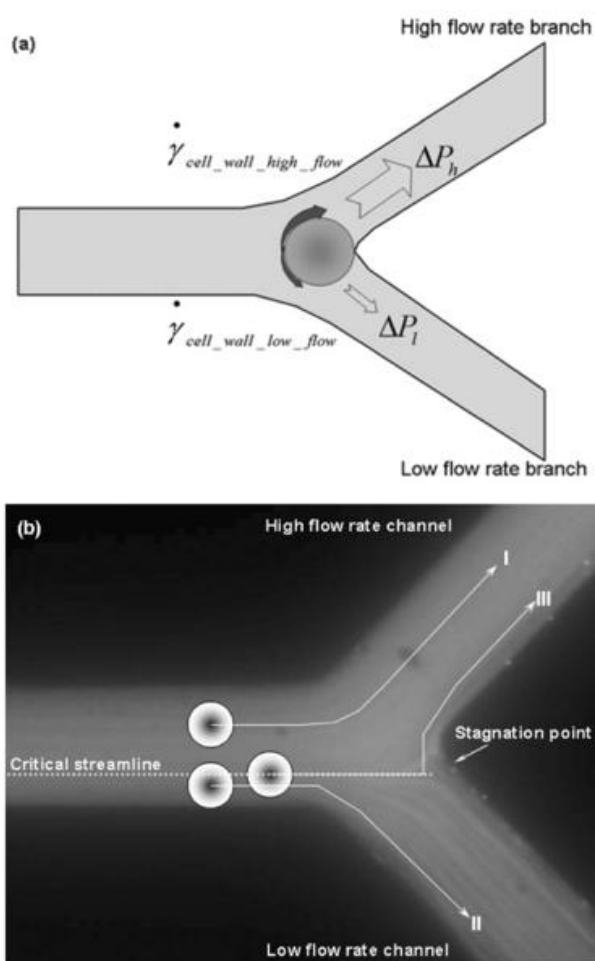


圖 2-1 分岔定律示意圖[47]

2.2 血液分離流道原理與微流道晶片設計

本論文之全血處理微流道晶片將依據下列文獻之流道特性進行設計。

圖 2-2 為結合鞘流與橫向流之被動式分離微流道，以鞘流的方式作為驅動血液的動力，將血液推向流道的一側，在血液被推向的該側側壁設計橫向流之分離流道結構，該結構是由極窄的通道口作為分離紅血球與白血球的依據，由於紅血球屬於體積較小(直徑為 2~6 μm)且延展性強的雙凹圓盤狀細胞，故紅血球會通過分離流道的窄口。相反地，白血球為體積較大(直徑為 6-15 μm)之球體形狀細胞，其延展性也不如紅血球，故白血球無法通過分離流道的窄口，與紅血球分離。圖 2-3 則是說明了當橫向流的結構與主流道夾 60 度時能有較高的分離效率。最後為了在同一個晶片上能夠實現同時分離血漿與分離血球的功能，故選擇用微珠將橫向流之分離流道填充塞滿，以過濾的方式進行血漿分離(圖 2-4)。

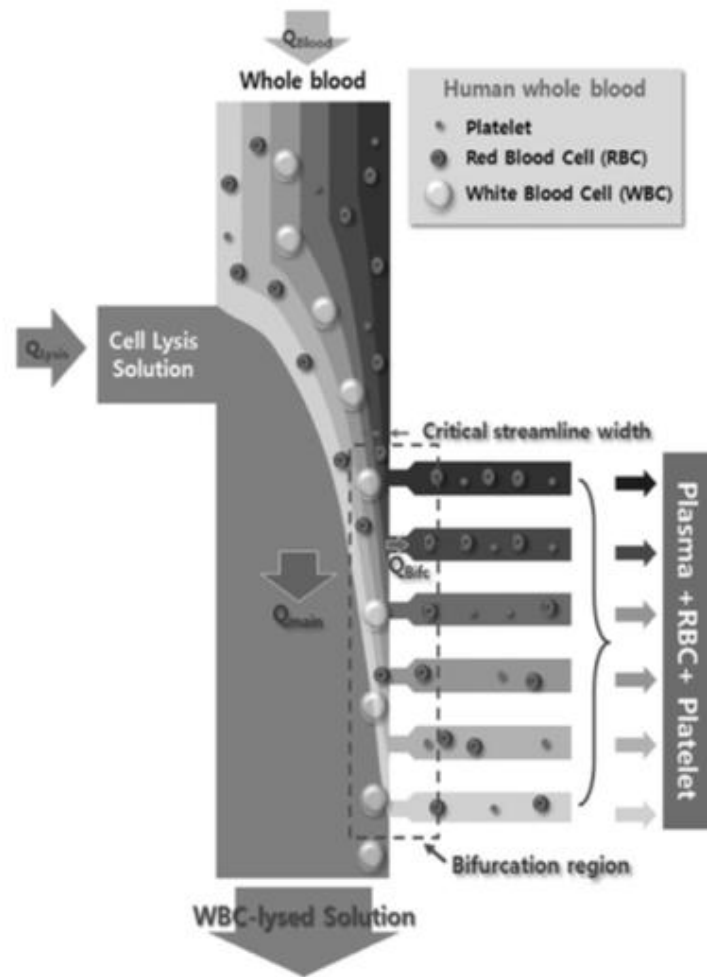


圖 2-2 鞘流分離血球示意圖[49]

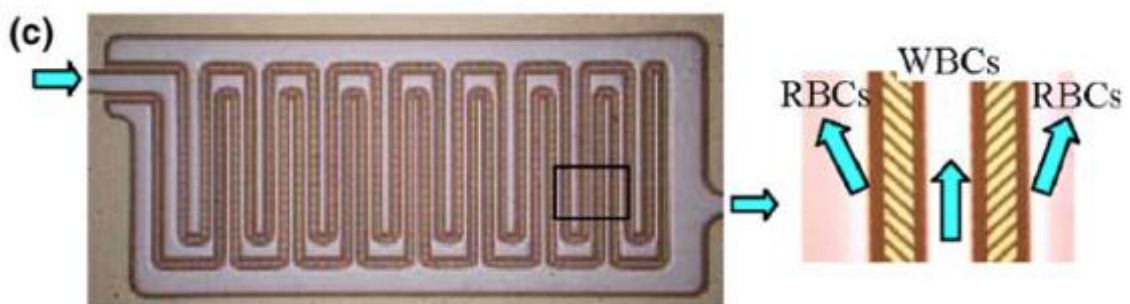


圖 2-3 60 度夾角之橫向流微流道晶片[50]

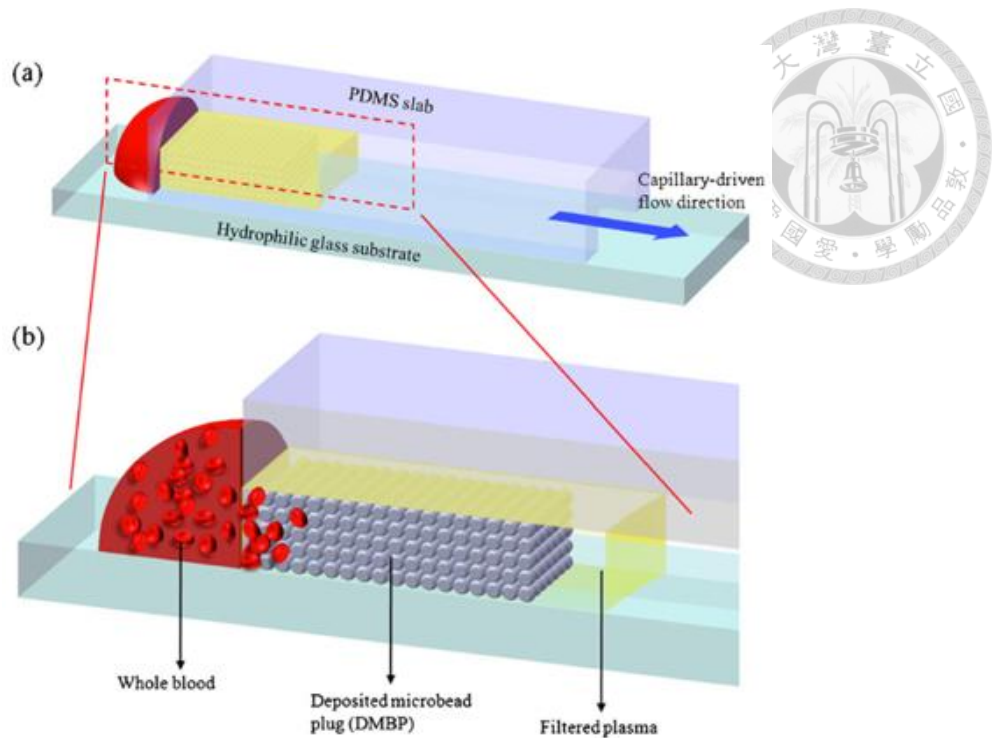


圖 2-4 微珠填充流道示意圖[51]

根據以上所述，本論文設計了一能夠同時分離血漿及分離血球之全血處理微流道晶片(圖 2-5(A))，流道厚度為 $25\mu\text{m}$ ，目的為確保血漿分離流道能順利地填充微珠，分別以全血入口(Whole Blood Inlet(WBI))、緩衝液入口(Buffer Inlet(BI))、血漿出口(Plasma Outlet(PO))、紅血球出口(RBC Outlet(RO))、白血球捕捉區域(WBC Trapping Zone)，廢液出口(Waste Outlet(WO))所組成。主要以功能分成三個部分，分別為血漿分離流道、血球分離流道(圖 2-5(B))，以及白血球捕捉區域(圖 2-5(C))。血漿分離流道是由六個分離流道所組成，並與主流道夾 60 度角，流道入口寬度為 $3\mu\text{m}$ ，流道之寬度為 $23.5\mu\text{m}$ ，六個流道在距離流道入口 $100\mu\text{m}$ 的地方合併成單一個流道，並在距離流道出口 $100\mu\text{m}$ 的地方再次分為六個流道，寬度為 $240\mu\text{m}$ ，此設計之目的是為了讓尺寸大小為 $10\mu\text{m}$ 之微珠能夠順利的填充流道。血球分離流道則是由四個 \sphericalangle 字型流道組成，與主流道夾 60 度角，流道入口寬度為 $3\mu\text{m}$ ，流道之寬度為 $23.5\mu\text{m}$ 。

最後，白血球捕捉區域分成兩種捕捉流道設計，一種為之字形捕捉區域(圖 2-5)，另一種為圓形捕捉區域(圖 2-6)。之字形捕捉區域分成過濾以及捕捉兩個區域，在上方的過濾區域是用來阻擋來自血液中非血球之之大型雜物，以 5 列 $10\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ 之長條形結構交錯排列而成，從上到下每列間距為 40、35、30、25、20 μm ；捕捉區域則是由三角形微柱與長條形微柱交錯排列而成之之字形陣列結構，三角形微柱之邊長為 $30\mu\text{m}$ ，長條形邊長為 $50\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ ，三角形微柱與三角形微柱之間距為 $30\mu\text{m}$ ，長條形微柱與長條形微柱之間距為 $10\mu\text{m}$ ，每一三角形微柱位於兩長條形微柱中間，並與長條形微柱垂直間距為 $2.5\mu\text{m}$ 。以一個三角形微柱及一個長條形微柱為一組捕捉單位，每一列有 29 組，列與列之間距為 $50\mu\text{m}$ ，共 48 列。假設一個捕捉單位能抓兩顆細胞，整個之字形捕捉流道能抓大約 3000 顆白血球。

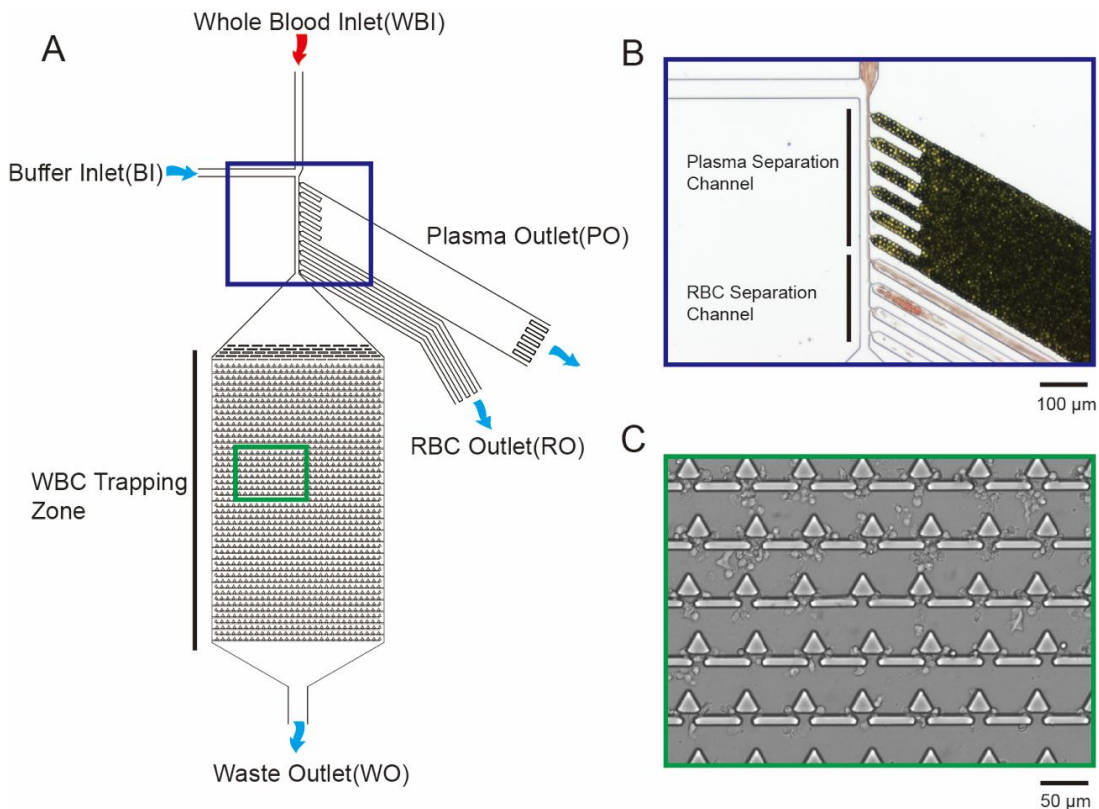


圖 2-5 之字形捕捉微流道設計示意圖。(A) 之字形捕捉微流道示意圖(B)血漿分離流道及血球分離流道示意圖 (C) 之字形捕捉流道之捕捉微柱影像

圓形捕捉區域則是由十圈圓形微柱陣列所組成，每圈微柱陣列皆有一較大之
間距出口，以降低每圈微柱陣列被白血球完全堵死的機率。每一圓形微柱直徑為
30 μm ，間距由內圈到外圈以 10 μm 到 2.5 μm 平均遞減，此外，圓形捕捉流道以內
圈三圈、中間三圈、外圈四圈分成三個捕捉區域以利白血球的計數。

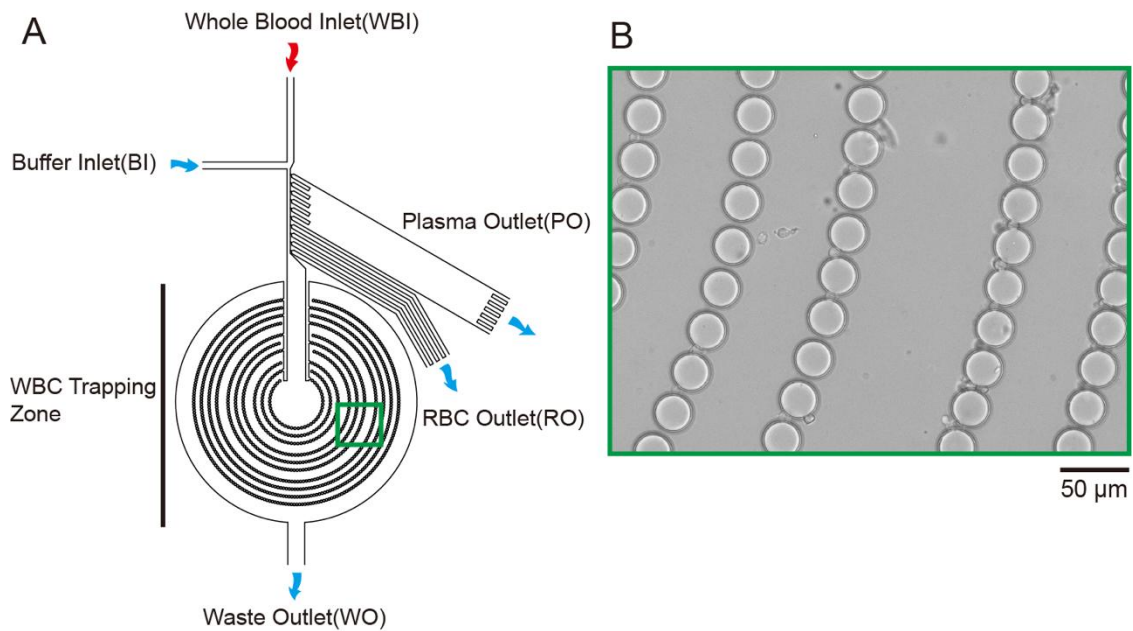


圖 2-6 圓形捕捉微流道設計示意圖。(A)圓形捕捉微流道示意圖(B)圓形捕捉流道之捕捉微柱影像



第 3 章 實驗流程

本章節首先將說明本論文之微流道的製作步驟，包含了以矽晶圓製作微流道模具之光微影製程，以及後續以 PDMS 翻模微流道晶片之軟微影製程。此外，將說明血液樣本之前處理、血漿分離微流道之微珠填充，最後則是以微流道進行大小微珠分離、血漿分離、血球分離的實驗架設流程。

3.1 晶片製程

在材料的選擇上，由於微流道所設計之厚度為 25 μm ，因此在光微影製程的部分選用 MICRO•CHEM SU8-2025 負光阻作為製作微流道模具的基材，另外在實際微流道晶片的部分則是以具有生物相容性的 PDMS 作為基材，整個微流道晶片的簡化製程步驟如下(圖 3-1)：

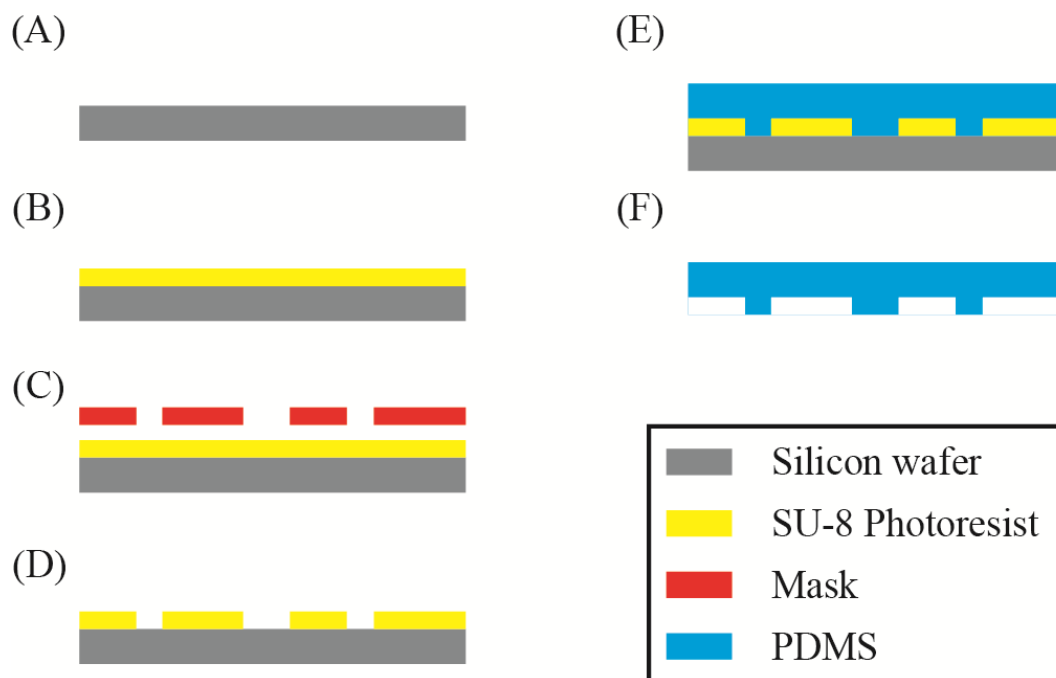


圖 3-1 光微影製程簡化流程圖 (A)將矽晶圓上的的雜質及氧化層去掉(B)在矽晶圓上塗佈 SU-8 負光阻(C)進行光罩圖案的曝光(D)將未受到曝光之多餘光阻去掉，

完成微流道模具(E)在微流道模具上倒入 PDMS 溶劑並使之固化(F)翻模實際



3.1.1 光微影模具製程流程

首先，在光微影製程的部分，全程於應力所奈米機電系統中心的無塵室中進行，無塵室本身提供製程所需之製程設備及高潔淨度環境，能夠擁有良好的製程品質。然而矽晶圓本身在保存的過程中，表面會與大氣接觸產生二氧化矽的氧化層，此外也容易受到空氣中懸浮粒子的沾黏，對於光阻在矽晶圓上的附著有極大的影響，因此在進入黃光製程之前，會先於蝕刻室透過清洗步驟去除矽晶圓表面上細小粒子及污染物的沾黏，並蝕刻二氧化矽氧化層，增加表面與光阻的附著性。清洗矽晶圓步驟如下：

1. 先後分別以丙酮、異丙醇在超音波震洗機(E120H, ELMA)(圖 3-2)中震洗 5 分鐘，再的去離子水沖洗矽晶圓表面，可以在不破壞表面結構的條件下有效去除表面微粒。



圖 3-2 超音波震洗機(E120H, ELMA)

2. 將矽晶圓浸泡在硫酸雙氧水(硫酸與雙氧水體積比 3:1)10 分鐘，此步驟主要是依硫酸雙氧水強氧化性和脫水性來破壞有機物的碳氫鍵結，達到去除有機不純物的效果。
3. 以去離子水沖洗殘餘在矽晶圓上之硫酸雙氧水溶液。



4. 由於矽晶圓在強酸或高溫下會加速表面氧化層的增長，會減少光阻對晶圓表面的黏附力，因此必須透過二氧化矽蝕刻液(buffered oxide etch, BOE)去除表面氧化層，並將表面變為疏水性，浸泡時間為 1 分鐘。
5. 以去離子水沖洗矽晶圓，並用氮氣槍吹乾大部分液體，爾後放入 120°烘箱中 10 分鐘，烤乾水分子，確保晶圓表面乾燥。

烤乾矽晶圓表面後，為了避免光阻受到環境中的紫外光或是特定波段的光照射激發，進而造成結構製作失敗，後續的製程步驟將於黃光室中進行。光阻是由高分子聚合物、感光劑、溶劑所組成，其中高分子聚合物含酸基，具有黏合劑的功能；感光劑為一光活性強的化合物，當受到特定波段的光照就會改變溶解度，使光阻溶於顯影液中；溶劑被用來溶解高分子聚合物及感光劑，使光阻能夠以旋轉塗佈法均勻平坦的分佈在矽晶圓表面形成薄膜。光阻形成結構的原理是因為溶劑中的感光劑於樹脂中進行交聯作用(cross-linking)，這些交聯後的高分子具有較佳的抗化學蝕刻能力，且難溶於顯影液。光阻又可分為正光阻及負光阻，正光阻本身難溶於顯影劑中，當光阻受到光照後感光劑的交聯作用被切斷，而使光阻結構可溶於鹼性顯影液中。正光阻於顯影時較不會因吸收顯影劑而膨脹，因此可得到較細的線寬結構，通常為業界製作積體電路所用；負光阻與正光阻相反，本身對於顯影液的溶解度高，經曝光後感光劑產生交聯作用，使受到光照的結構難溶於顯影液。負光阻與正光阻相比雖然結構解析度較差，但已經符合製作微流道晶片模具的需求，而且成本較為低廉，因此負光阻是目前最為常見的微流道模具製作原料。本論文實際黃光製程步驟如下：

1. 將測試用矽晶圓放置於旋轉塗佈機(AGS1006T)(圖 3-3)的真空吸頭上，開啟真空幫浦，並設置三階旋轉，第一階 500rpm，時間 15 秒，此階段目的是使

光阻能夠均勻分佈在矽晶圓表面；第二階 1500rpm，時間 15 秒，此階的目的是為了讓光阻在穩定的加速度下降低厚度；第三階 3500rpm，時間 40 秒，此階段為控制最終光阻薄膜厚度最重要的階段。各階段加速度均為 100rpm/sec。



圖 3-3 旋轉塗佈機(AGS1006T)


2. 設置完成後，開始試轉，測試矽晶圓是否在三個階段的旋轉中，皆能穩定的固定於吸頭上。
3. 將已經過清洗後之矽晶圓以氮氣槍再次吹淨後，放置於旋轉塗佈機的真空吸頭上，開啟真空幫浦，並滴上約 50 元硬幣面積的 SU-8 2025 光阻，接著根據實驗步驟 1 所設置的轉速開始旋轉塗佈。
4. 將塗佈完光阻的矽晶圓放置在加熱板上進行軟烤，軟烤溫度為 95°C，時間為 5 分鐘，目的是使光阻中的溶劑蒸發，讓光阻層從原先的黏稠液體成為較乾燥的薄膜層，並增加光阻對晶圓表面的附著力。
5. 將軟烤後的矽晶圓降至室溫，並放置於單面對準曝光機(EVG620)(圖 3-4)中的曝光平台上，並放上已黏上膠片光罩的光罩玻璃，開啟真空幫浦固定。接著設定曝光參數，包含曝光時間及對位間距，曝光時間設定為 7 秒，對位間距設定為 80 μ m。



圖 3-4 曝光機(EVG620)

6. 曝光後將矽晶圓放置在加熱板進行曝後烤，第一烤為 65°C ，時間為 1 分鐘；第二烤為 95°C ，時間為 5 分鐘。由於在曝光時，部分未被感光劑吸收的光能會穿透到基底，並且反射與入射光產生干涉現象，而引起駐波現象造成整體曝光強度不一，而曝後烤能使光阻結構重新排列，減少此現象對結構的影響程度，幫助後續顯影步驟的成功性。
7. 曝後烤後將矽晶圓放入容器中並倒入 SU-8 顯影液中進行顯影，時間約為 30 至 40 分鐘，並在過程中保持均勻搖晃，幫助細部結構的顯影效果。時間結束後，以異丙醇將殘餘在晶圓表面之顯影液沖洗掉，再的去離子水沖洗掉異丙醇，最後以氮氣槍吹乾。
8. 將矽晶圓放上 200°C 的加熱板進行硬烤，此步驟目的為將光阻中之溶劑量減至最低，並消除因顯影時造成之表面應力，時間約 10 分鐘。

3.1.2 光微影製程之參數設定



光微影製程參數皆參考 MICRO•CHEM 所提供的資料庫，並結合過去學長姐實際製程的經驗來做些許的參數變動，以下將說明各項參數的依據。本論文之微流道選用之製程基材為負光阻 SU-8 2025，屬於較為黏稠的光阻，不需在晶圓上倒入過多光阻劑，只需約 50 元硬幣直徑的大小。模具結構目標為 25 μm ，根據資料庫提供的轉速與厚度之對照圖(圖 3-5)，決定與目標厚度相應之轉速，目標轉速為 3500rpm。根據資料庫所述，建議將旋轉設定成兩個階段，目的在於第一階段能夠將光阻平均分佈在矽晶圓上，第一個階段轉速為 500rpm，時間為 10 秒，加速度為 100rpm/sec；第二階段則是將均勻分布的光阻降低至我們的目標厚度，第二階段轉速為 3500rpm，時間為 30 秒，加速度為 300rpm/sec。然而根據之前的實驗經驗，3500rpm 屬於高轉速，將旋轉階數設定為三階，可得到較為平坦的光阻薄膜層，第一階轉速 500rpm，時間 15 秒，加速度 100rpm/sec；第二階轉速 2000rpm，時間 15 秒，加速度 100rpm/sec；第三階轉速為目標轉速，即 3500rpm，時間 40 秒，加速度 100rpm/sec。

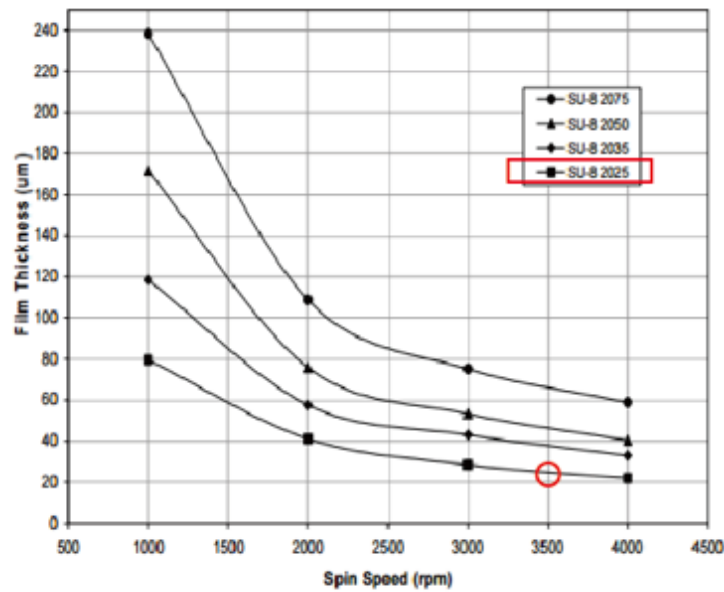


圖 3-5 塗佈厚度與轉速對照圖

將光阻均勻塗佈在矽晶圓上之後，會將矽晶圓放上加熱板進行軟烤，目的是將光阻內部的有機溶劑蒸發，並使光阻凝固成半固體的狀態，不同厚度的光阻結構所需的加熱時間也不相同。在實際中，為了使矽晶圓受熱均勻以及保持加熱板的乾淨，會再加熱板上墊上一層鋁箔紙，但也因此造成矽晶圓底下的溫度不足，使光阻層受熱不足，導致在後續接觸曝光階段，使結構容易受損。因此在本論文中軟烤步驟會在 95°C 加熱階段增加 5°C，使溶劑蒸發量足夠，因此實際軟烤溫度為 100°C，時間為 5 分鐘。

根據過去的實驗經驗，軟烤後矽晶圓上仍會呈現有部分未凝固的液態，如果直接進行曝光，矽晶圓會因此沾黏在光罩上，使得沾黏的部分結構被破壞，甚至會在光罩上留下沾黏的痕跡，影響下次製程實驗。因此，將軟烤後之矽晶圓在室溫放置約 5 分鐘待其降至室溫後再進行曝光。SU-8 2025 負光阻在感光後產生交聯作用，使結構強度增加而不會溶於顯影劑。曝光機光源為波長 365nm 的紫外光，曝光強度為 10.7mW/cm²。根據資料庫，所需曝光能量為 150mJ/cm²，然而根據實驗經驗，


若依造說明書內所建議的曝光能量進行曝光，會造成光阻過曝的現象，使流道寬度變寬，且由於使用之光阻 SU8-2025 年份較舊，導致品質有些許不良，因此根據製程上的經驗將減少曝光能量 50%，實際所需曝光能量為 $75\text{mJ}/\text{cm}^2$ ，曝光時間設定為 7 秒。

曝光後會進行曝後烤的步驟，此步驟目的是將光阻內殘留的有機溶劑量降到最低，使交聯後的光阻結構更加穩定，未交聯的光阻結構則是被顯影劑溶解，不同厚度的光阻結構需要不同的加熱時間。根據經驗，在 95°C 時需要多烤約 1 分鐘才能使有機溶劑完全蒸發，另一方面與軟烤相同，將溫度設定提高 5°C 以抵銷鋁箔紙造成的溫度不足，故實際曝後烤步驟為第一階段 70°C ，時間為 1 分鐘，第二段 100°C ，時間為 5 分鐘。

曝後烤後會進行顯影及硬烤的步驟，顯影的目的是將未感光而無交聯作用產生的光阻結構溶解，而使流道結構顯露出來，根據資料庫， $25\mu\text{m}$ 的結構需要約 4 至 5 分鐘的顯影時間。然而，本論文設計的光罩之最小線寬為 $2.5\mu\text{m}$ ，根據實驗室研究的操作經驗，如此細小之結構在短時間的顯影下容易有溶解未完全的情形，且 SU-8 系列的光阻在感光交聯後屬於一種穩定之結構，幾乎不會有過顯的現象出現，因此實際上顯影步驟會進行 30 至 40 分鐘，並以肉眼及顯微鏡進行顯影程度的判斷。另一方面，硬烤是為了使光阻結構更加堅固，能承受後續的翻模，根據說明書建議硬烤溫度為 200°C ，時間為 30 分鐘。

3.1.3 軟微影製程

在光微影製程的步驟之後，將使用聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 做出微流道晶片。PDMS 為一生物相容性佳、透明性高、可塑性良好之高分子有機矽化合物，是一種由主劑 (A 劑) 以及硬化劑 (B 劑) 依特定比例所混合而成之



黏稠液體，並透過加熱固化後，形成一高彈性之透明固體。目前 PDMS 用於微流道的製作是屬於一種軟微影製程，透過將液態之 PDMS 倒至矽晶圓模板上，矽晶圓上的微結構會因此被轉印至 PDMS，以烘箱固化後翻模，再經過切割、打孔、封裝等後製程，即可得到具有微流道結構之 PDMS 晶片。其中封裝製程的部分使用氧氣電漿組合法(Oxygen plasma bonding method)將固化後的 PDMS 與載玻片結合，其原理為對低壓腔體內的氧氣施加電漿，而使氧氣解離並產生大量的自由基粒子，這些自由基粒子會與碳氫化合物及表面的氧化物發生反應，造成腔體內材料表面氧化，而 PDMS 表面在此種環境下，會產生如羥基或羧基等官能機，這些官能機取代了原有的高分子鏈，使表面特性改變，並使之能與其他同樣經此種方法改變表面性質後的矽衍生物之表面結合。以下為詳細之軟微影製程步驟：

1. 配置 PDMS 溶液。將 A 劑、B 劑以及矽油(利於 PDMS 固化後的脫模)以重量比 10：1：0.3 的比例加入容器，並以打蛋器混合均勻。
2. 將混合均勻之 PDMS 放入真空皿中並抽出氣泡，抽真空時間為 20 分鐘，破完真空後靜置 5 分鐘。
3. 以氮氣槍清潔矽晶圓模具表面上沾粘的灰塵，接著倒入已除氣泡之 PDMS 液體，並保持水平確保 PDMS 能填滿整個模具。
4. 將倒入 PDMS 後之模具再次放入真空皿，抽出 PDMS 倒入模具時所形成之氣泡，抽真空時間為 20 分鐘，破完真空後靜置 5 分鐘。
5. 將抽完氣泡之矽晶圓模具與 PDMS 放入 60°C 烘箱，為了確保 PDMS 固化完全並且能脫模，烘烤時間為 4 小時。
6. 取出烤乾之矽晶圓模具與固化之 PDMS，以解剖刀小心的切割並取下所需要的微流道區域，即完成翻模步驟。

7. 以 0.5mm 的打孔器在流道的入口處打洞，並以 1mm 的打孔器在流道的出口處打洞，接下來以膠帶仔細清潔 PDMS 微流道的表面，避免任何灰塵微粒的沾粘。
8. 取載玻片，並以酒精清潔表面，再以氮氣槍吹乾。
9. 將 PDMS 與載玻片同時放入氧電漿機 (PDC-001, Harrick plasma)(圖 3-6) 的腔體內，並關閉腔體門。



圖 3-6 氧電漿機 (PDC-001, Harrick plasma)

10. 開啟機台電源及真空幫浦電源將腔體壓力抽至 0.2mmHg，接著旋轉分向閥，將氧氣輸入管線壓力抽至 0.43mmHg，再將氧氣鋼瓶氣閥打開，使壓力計刻度維持在 0.58mmHg~0.62mmHg，時間 10 分鐘。
11. 將電漿強度調整鈕旋轉至 HI，並計時 1 分鐘，此時會觀測到腔體內部為淡藍的藍白色，結束後將調整鈕旋轉回 OFF。
12. 取出 PDMS 與載玻片，並關閉腔體門，接著將 PDMS 以鑷子夾住輕輕放上載玻片，並以鑷子稍微輕壓，以確保兩者能完整地結合。
13. 將結合的 PDMS 與載玻片放入 60°C 烘箱，時間 20 分鐘，此步驟目的為加強 PDMS 與載玻片介面之間的結合力。
14. 從烘箱取出物品，完成 PDMS 微流道晶片。



3.1.4 微流道晶片之填充微珠製程

在萃取血漿之實驗中，以微珠填充流道的方式形成過濾血球之結構，為了不讓紅血球通過且能在不完全封死流道的情況下使血漿通過，因此使用之微珠尺寸為 $10\mu\text{m}$ ，以下為填充微珠製程之步驟：

1. 將 3.1.3 所完成之 PDMS 微流道晶片放於倒立式螢光顯微鏡 (IX73, Olympus) 載物平台上。
2. 調配微珠溶液，以 PBS 緩衝溶液微珠原液稀釋 10 倍，稀釋後濃度約 4.5×10^6 particle/mL。
3. 架設蠕動幫浦，選擇管徑為 0.5mm 之專用太空管，與填充流道口連接，以推式運作，並設定流速 5 rpm。
4. 以流速 5rpm 流入微珠溶液約 10 秒後，以鑷子在微流道上方稍作按壓，使微珠以較穩定之排列模式填充流道。
5. 接著按下蠕動幫浦快轉鍵，目的是為了使微珠能填充得更為緊密，以顯微影像觀測，待微珠填滿整個填充流道後按下停止鍵，並輕緩地將太空管拔起。
6. 使太空管充滿空氣後再次連接填充流道，以流速 $5\mu\text{L}/\text{min}$ 將空氣打入，確保微珠不會溢出填充流道。
7. 將填充完之微流道晶片再次放入烘箱烤乾，使微珠能夠更穩定的附著在流道中，為了確保完全烤乾，烘烤時間約為 8 小時。

3.2 血液樣本處理

3.2.1 血液樣本取得

本論文所使用之血液樣本皆取自台大醫院，其來自於李任光醫師所開刀的病

人。血液樣本必須每週事先預約，並在接獲醫院的通知後，立即前往取得血液樣本，接著返回實驗室進行各項實驗。由於取得之血液樣本為當日下午開刀所採集，裝在採血管中仍未穩定，故運送過程須小心並減少晃動，以免溶血等意外發生，造成實驗結果之誤差。本論文之血液樣本保存於紫頭採血管，其含有 EDTA 抗凝血劑，會使血液中之血球不會凝結成塊，能夠維持剛從病人身上抽取完之狀態以利實驗進行。

3.2.2 吸光度量測血漿稀釋倍率

由於本論文是利用 PBS 緩衝溶液當作，將使用 Nanodrop 吸光度機對血漿進行吸光度之量測，其原理為血漿中蛋白質的芳香族胺基酸會吸收 280nm 波長光源，造成吸光值的改變，藉此定量樣本中之血漿濃度。為了計算從微流道收集之血漿的稀釋倍率，藉由吸光度機量測不同稀釋倍率的手動稀釋血漿之吸光值，並建立檢量線，以檢量線回推出從微流道收集之血漿大略的稀釋倍率。稀釋血漿之量測步驟如下：

1. 將血液樣本取 2mL 並以離心管分裝成兩管。
2. 使用離心機將血液樣本分層。離心轉速設定為 500g，時間為 10 分鐘。
3. 將離心管取出，並將上層之血漿輕緩地以微量吸管收集。
4. 以 PBS 緩衝溶液依序將血漿手動稀釋成以下倍率：0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1。
5. 將 Nanodrop 機台開機，待其自動初始化。
6. 選擇 protein-A280 之設定介面後，滴上 PBS 緩衝溶液進行吸光度的校準。
7. 依序將手動稀釋之血漿滴上機台量測吸光度，使用完以去離子水擦拭偵測區，並將量測結果存取。



3.2.3 白血球染色

為了使捕捉到之白血球能有初步的統計，在微流道實驗之前，將對全血中之白血球進行染色。本論文實驗中所選用之細胞螢光染色劑為鈣黃綠素-AM (Calcein-AM) (Life Technologies)。Calcein-AM 為一種對於活細胞進行螢光標記之染色試劑，屬於 Calcein (鈣黃綠素) 的衍生物，相較 Calcein，Calcein-AM 增加了疏水基團的修飾，因此能夠輕易的穿透活細胞膜，當其進入細胞質後，酯酶會將其水解為鈣黃綠素，並留在細胞質內發出黃綠色之螢光，以此標定細胞，其激發波長及發射波長分別為 490nm 和 515nm。Calcein-AM 平時應保存於-20°C 且避光的環境下。配置 Calcein-AM 溶液方法如下：

1. 以二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)為溶解粉末狀 Calcein-AM 之溶劑，所使用的比例為 50 μ L 的 DMSO 以及 50 μ g 的 Calcein-AM，混合成 50 μ L，濃度為 1mM 之 Calcein-AM 溶液。
2. 根據血液樣本體積加入百分之一之 Calcein-AM 溶液，使其濃度達到 10 至 100 μ M。如本實驗每次準備約 1mL 的血液樣本，則需加入約 10 μ L 之 Calcein-AM 溶液。

3.2.4 血球計數

本論文所使用之血球計數工具為常見的拋棄式細胞九宮格計數盤，如，使用方法簡單、快速。由於每次實驗所使用之血液樣本所含的血球濃度皆不相同，白血球濃度約 4000 至 10000 顆/ μ L；而紅血球濃度則約 450 萬至 550 萬顆/ μ L，兩者濃度皆過高，不利於九宮格計數盤計數，為了計數方便，將會對染色後之血液樣本以及白血球捕捉實驗之結果進行特定比例之稀釋，接著再進行細胞計數，計數步驟如下：

1. 由細胞計數盤之開口處滴入欲測量濃度之樣本 10 μ L。

2. 將滴入樣本後之細胞計數盤放於倒立式螢光顯微鏡載物平台上，並以相位觀察法觀測並計數。
3. 九宮格計數盤之計數方法為，取九宮格中的四角，並分別計算其中之細胞數目，取平均數後乘上 10^4 倍，即為大略之樣本細胞濃度(細胞顆數/ml)，例：若計算出來之平均數為 30，則代表樣本中的細胞濃度約為 3×10^5 cells/ml。



圖 3-7 細胞計數盤


3.3 微流道實驗

本論文中，微流道實驗主要分成三個部分進行，首先，第一部分為血漿萃取實驗，將測試以微珠填充之流道是否能將全血中之血漿萃取出來，並進行稀釋倍率之量測。第二部分則是白血球捕捉實驗，目的在於驗證本論文所設計之兩種捕捉微柱捕捉白血球之效率。最後一部分為大小微珠分離實驗，由於希望未來能對捕捉到之白血球能有進一步地分類，因此以兩種大小之微珠進行流道測試。

3.3.1 血漿純化實驗

血漿純化實驗是利用尺寸 $10\mu\text{m}$ 之微珠將流道緊密填充，形成一具有過濾功能之三維結構，借此將被橫向流推向血漿分離流道的全血樣本進行血球血漿分離，並以微量吸管收集分離後的血漿。實際實驗步驟如下：


1. 取出微流道晶片，並在入口及出口處滴上 PBS 緩衝溶液使流道與外界隔絕。

- 
2. 將微流道晶片放入真空皿中抽真空 15 分鐘，使流道中的氣體被抽出。
 3. 在等待抽真空期間，架設兩台針筒幫浦，皆以推式模式運作，選擇管徑分別為 14.5mm 以及 4.78mm 的針筒，並設定流速分別為 3 及 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。
 4. 將真空皿完全破真空後放置 5 分鐘，使液體充滿整個流道。步驟 2 及步驟 4 目的是為了避免實驗時空氣在流道中形成氣泡，進而影響實驗進行。
 5. 將管徑 14.5mm 的針筒抽入約 5mL 之 PBS 緩衝溶液，並將針筒內空氣排出後，架於針筒幫浦上；管徑 4.78mm 的針筒則是抽入約 0.6mL 之血液樣本，並架於另一台針筒幫浦上。
 6. 將抽真空完的微流道晶片放至倒立式螢光顯微鏡載物平台上，並將兩針頭與晶片之相應入口端連接；白血球與紅血球出口端則是插上體積 20-200 μL 的微量吸管之吸管尖，連接過程必須避免氣泡於交接處產生。
 7. 實驗過程中，以 2.5 μL 的微量吸管吸取填充流道所溢出之血漿，避免液體蒸發，造成誤差。
 8. 將收集之血漿以吸光度機測量吸光度值

3.3.2 使用 2 μm 及 10 μm 微珠模擬分離紅、白血球實驗

在實際進行全血之紅、白血球微流道分離實驗之前，本小節設計了利用本微流道將 2 μm 及 10 μm 的微珠進行分離，模擬實際紅、白血球的分離情況，以證實本論文之微流道在設計原理上是可以運行的，實驗步驟如下：

1. 配製微珠溶液，以 PBS 緩衝溶液將 2 μm 及 10 μm 微珠混合配製成 1mL 之微珠溶液，2 μm 及 10 μm 個別濃度為 5×10^7 particle/mL 以及 4.5×10^5 particle/mL。
2. 在微流道晶片入口及出口處滴上 PBS 緩衝溶液，使流道與外界隔絕。
3. 將微流道晶片放入真空皿中抽真空 15 分鐘，使流道中的氣體被抽出。

- 
4. 在等待抽真空期間，架設兩台針筒幫浦，皆以推式模式運作，選擇管徑分別為 14.5mm 以及 4.78mm 的針筒，並設定流速分別為 3 及 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。
 5. 將真空皿完全破真空後放置 5 分鐘，使液體充滿整個流道。步驟 2 及步驟 4 目的是為了避免實驗時空氣在流道中形成氣泡，進而影響實驗進行。
 6. 將管徑 14.5mm 的針筒抽入約 5mL 之 PBS 緩衝溶液，並將針筒內空氣排出後，架於針筒幫浦上；管徑 4.78mm 的針筒則是抽入約 0.6mL 步驟 1 之微珠溶液，並架於另一台針筒幫浦上。
 7. 將抽真空完的微流道晶片放至倒立式螢光顯微鏡載物平台上，並將兩針頭與晶片之相應入口端連接；兩出口端則是插上體積 20-200 μL 的微量吸管之吸管尖，連接過程必須避免氣泡於交接處產生。
 8. 從顯微鏡的影像確認捕捉情形，並以 CCD 擷取微珠捕捉情況之影像。

3.3.3 白血球捕捉實驗

為了確定本論文所設計之白血球捕捉結構是否能夠捕捉到血液樣本裡的白血球，使用 Calcein-AM 螢光染色之血液樣本，將之字形捕捉區域及圓形捕捉區域的捕捉情況，以螢光影像紀錄。實驗步驟如下：

1. 在微流道晶片之兩個出口處滴上濃度為 3% 的 Pluronic 溶液，為了防止血球沾黏於較窄之流道中，造成流線偏移，影響實驗結果。
2. 在微流道晶片之兩個入口處滴上 PBS 緩衝溶液。由於 Pluronic 溶液屬於過飽和溶液，在入口或出口處會有析出物造成流道堵塞，而在出口處之析出物不會流入流道內，因此只需在入口處滴上 PBS 緩衝溶液即可。
3. 參考 3.3.1 之步驟 2~6，步驟 5 所使用之血液樣本為 3.2.3 所染色之血液樣本。



4. 開啟汞燈及白光光源，並對微流道進行對焦。
5. 開啟針筒幫浦，以即時顯微影像確認樣本與緩衝液皆有流入，並在實驗全程以拍攝影片紀錄。
6. 實驗結束後拍攝整個捕捉區域之影像，並拍攝放大之局部捕捉影像。
7. 將兩個出口處之微量吸管取出，收集溶液，並以九宮格計數盤計算紅、白血球數量。

3.3.4 使用 4.5 及 10 μm 微珠模擬不同尺寸的細胞捕捉實驗

本論文將圓形捕捉區域之圓形微柱設計成間距由 10 μm 到 2.5 μm 遞減，期望能夠對捕捉到之白血球能夠依據其大小有進一步的分類，例如體積較大之癌症細胞、循環腫瘤細胞等稀少細胞，因此將以尺寸為 4.5 μm 及 10 μm 之微珠進行初步的測試。實驗步驟如下：

1. 以 PBS 緩衝溶液配製三管微珠溶液，分別為 1mL 之 4.5 μm 微珠溶液，濃度為 5×10^7 particle/mL；10 μm 微珠溶液，濃度為 4.5×10^5 particle/mL；4.5 μm 、10 μm 微珠混合溶液，個別濃度為 5×10^7 particle/mL 以及 4.5×10^5 particle/mL。
2. 在微流道晶片入口及出口處滴上 PBS 緩衝溶液，使流道與外界隔絕。
3. 將微流道晶片放入真空皿中抽真空 15 分鐘，使流道中的氣體被抽出。
4. 在等待抽真空期間，架設兩台針筒幫浦，皆以推式模式運作，選擇管徑分別為 14.5mm 以及 4.78mm 的針筒，並設定流速分別分別為 3 及 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。
5. 將真空皿完全破真空後放置 5 分鐘，使液體充滿整個流道。步驟 2 及步驟 4 目的是為了避免實驗時空氣在流道中形成氣泡，進而影響實驗進行。
6. 將管徑 14.5mm 的針筒抽入約 5mL 之 PBS 緩衝溶液，並將針筒內空氣排出後，架於針筒幫浦上；管徑 4.78mm 的針筒則是抽入約 0.6mL 步驟 1 之 4.5 μm



微珠溶液，並架於另一台針筒幫浦上。

7. 將抽真空完的微流道晶片放至倒立式螢光顯微鏡載物平台上，並將兩針頭與晶片之相應入口端連接；兩出口端則是插上體積 20-200 μ L 的微量吸管之吸管尖，連接過程必須避免氣泡於交接處產生。
8. 從顯微鏡的影像確認捕捉情形，並以 CCD 擷取微珠捕捉情況之影像。
9. 以新的微流道晶片重複步驟 6-8，並將 4.5 μ m 微珠溶液更換成 10 μ m 微珠溶液。
10. 以新的微流道晶片重複步驟 6-8，並將 4.5 μ m 微珠溶液更換成 4.5 μ m、10 μ m 微珠混合溶液。

第 4 章 實驗結果與討論



4.1 微流道製作結果與量測

圖 4-1 為實際透過微奈米製程以及軟微影製程所翻模出來的 PDMS 微流道晶片在倒立式螢光顯微鏡下的細部結構影像，在血漿分離流道與血球分離流道的流道入口為 $3\mu\text{m}$ ，實際量測之平均寬度為 $2.96\pm 0.3\mu\text{m}$ ，雖然流道寬度有如預期，但是入口處的製程結果從一直線流道便為一由寬至窄的流道，可能會使白血球通過分離流道，降低分離效率；之字形捕捉區域的垂直間距為 $2.5\mu\text{m}$ ，實際量測之平均寬度約為 $2.16\pm 0.2\mu\text{m}$ ，雖然微柱結構之設計極為細小，導致製程完之結構形狀較為圓鈍，但因減少曝光時間使得間距比設計來得小，對於捕捉到之白血球可能有更強的保留性；圓形捕捉區域微柱間距由內圈到外圈為 $10\mu\text{m}$ 到 $2.5\mu\text{m}$ 平均遞減，實際量測結果每圈平均誤差皆在 $\pm 0.3\mu\text{m}$ 以內，與設計結果相符。

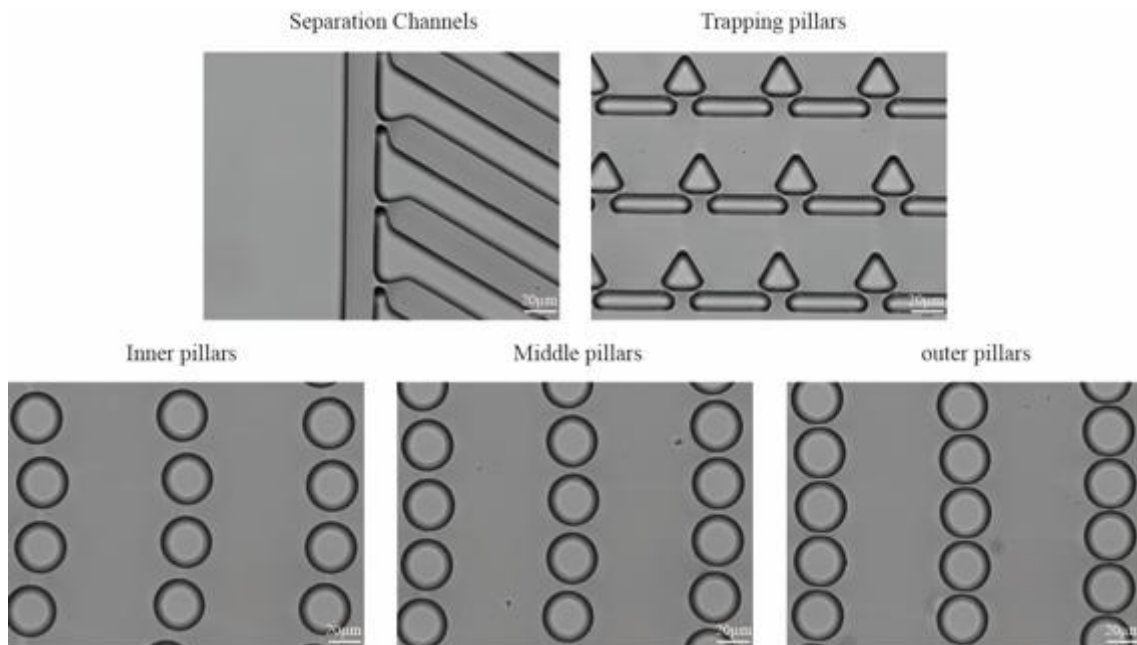


圖 4-1 細部結構之顯微鏡影像

4.2 2 μm 及 10 μm 微珠模擬紅、白血球分離結果

本節利用 2 μm 及 10 μm 兩種不同尺寸之微珠分別代表紅血球及白血球，並以微流道進行分離的實驗，說明本微流道已經具有將 2 μm 及 10 μm 微珠分離的能力。根據實驗結果，在紅血球出口(RO)並未收集到 10 μm ，故 10 μm 微珠的分離效率為 100%(圖 4-2(A))。另一方面，在捕捉區域可以看到被分離的 10 μm 微珠 (圖 4-2(B))，但是其捕捉到的數量遠小於預期，根據實驗觀察，部分 10 μm 微珠停留在流道入口處並沒有流入微流道中，另外推測也有可能為沾黏在針頭及太空管中所致。

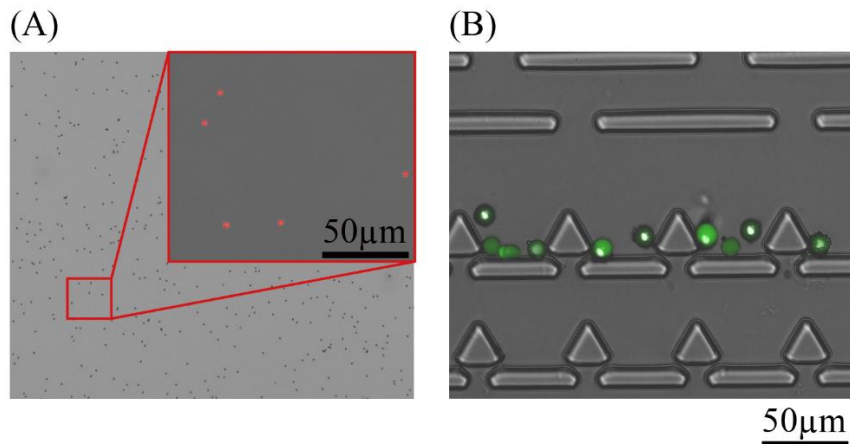


圖 4-2 微流道模擬分離血液之微珠影像(A) RO 收集之 2 μm 微珠影像圖(B)白血球捕捉區域之 10 μm 微珠影像圖

4.3 純化血漿結果與稀釋倍率量測

為確認全血樣本通入微流道晶片後的血漿純化及稀釋情況，本實驗將收集到之分離血漿放在倒立式螢光顯微鏡觀察，根據顯微鏡影像，從微流道實驗所收集的血漿中含有少量之紅血球細胞，約為原始紅血球濃度的 0.25%，其中有部分外型與紅血球不相同，但大小又介於紅血球及血小板之間，因此根據控制組影像對照，推測可能為血小板或是由於放置時間太久破裂萎縮之紅血球(圖 4-3)。為了計算微流

道實驗分離出來的血漿之稀釋倍率，本次實驗使用了兩個來源不同的血液樣本，將利用吸光度機進行手動稀釋血漿的吸光度量測，並計算其檢量線(圖 4-4(A)、(C))，接著對微流道分離出來的血漿進行吸光度量測，如圖 4-4(B)及(D)所示，本次實驗的兩個血液樣本分離之血漿稀釋倍率分別在 2.2 至 2.5 倍及 1.3 至 1.7 倍，根據實驗觀察，推測是因為發現樣本一的血球沉降速度較樣本二來得慢，故在微流道晶片中的血球濃度較低，使得緩衝液較容易混入血漿中，稀釋倍率變高。透過本次實驗的結果證實本論文設計之微珠填充分離流道能夠直接從全血樣本中分離出低稀釋倍率之血漿，且僅含極少量之血球細胞，其含量與大部分血漿之文獻所相比是差不多的。

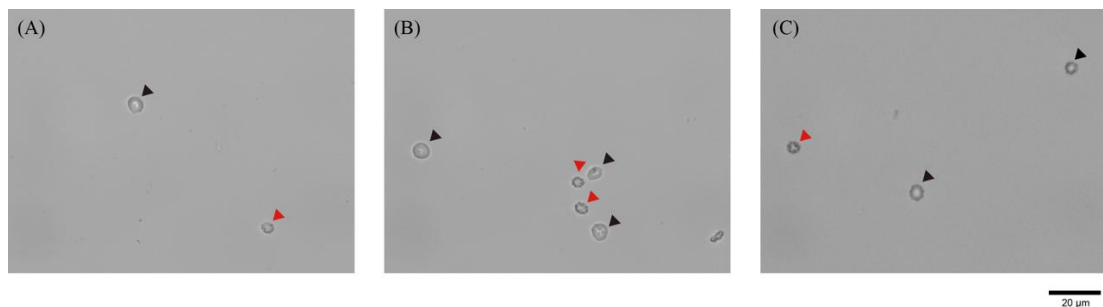


圖 4-3 微珠填充流道純化之血漿以及其控制組影像(黑色箭頭表示紅血球細胞，紅色箭頭表示血小板或破裂紅血球)，(A)全血稀釋 1000 倍並靜置於室溫 30 分鐘 (B)全血稀釋 1000 倍並用 vortex 攪拌後靜置於室溫 30 分鐘(C)微珠填充流道純化之血漿影像

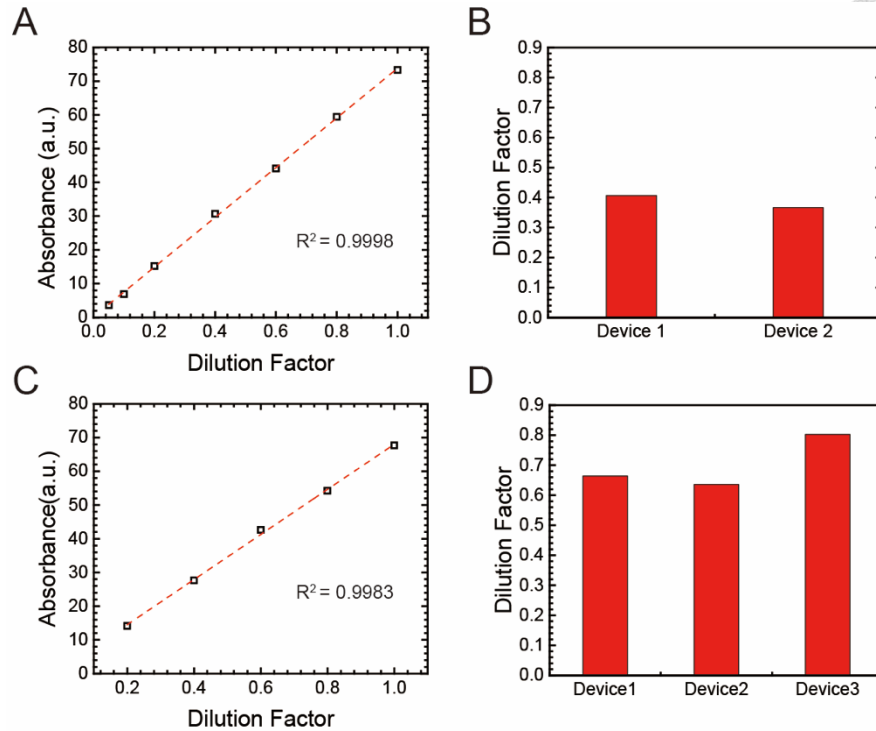
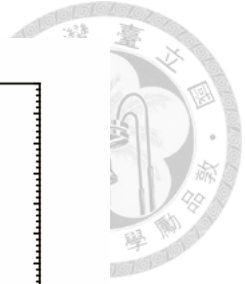


圖 4-4 微珠填充流道分離血漿實驗結果。(A)樣本 1 之血漿手動稀釋檢量線(B) 樣本 1 之微流道分離稀釋血漿結果(C)樣本 2 之血漿手動稀釋檢量線(D) 樣本 2 之微流道分離稀釋血漿結果

4.4 全血分離紅血球結果

本節將對微流道晶片分離紅血球之結果與效率進行說明。本論文將台大醫院採集回來之血液樣本進行染色並以以 PBS 緩衝溶液稀釋 100 倍後進行計數，經過計算後本實驗流入微流道之血液紅血球濃度(Input RBC concentration)約為 3.96×10^6 顆/ μL ，白血球濃度(Input WBC concentration)約為 8000 顆/ μL 。

由於本論文之微流道晶片有兩個輸入端，如圖 4-5 所示，當流體流入微流道後會產生壓力導致流速改變，因此根據設定流速流入之血液體積與實際流入之血液體積會有所差異。在本次實驗中，在 PO 及 WO 個別收集到 0.025% 及 0.3% 之紅血球，圖 4-6 為三個流道出口所收集之血球影像，分別為(A)PO、(B)RO 及(C)WO，



其中，由於 RO 所收集之血球濃度極高，因此在影像的觀察上事先手動稀釋 100 倍，這也表示大部分之紅血球都被分離至 RO，藉此能捕捉較高純度的白血球。

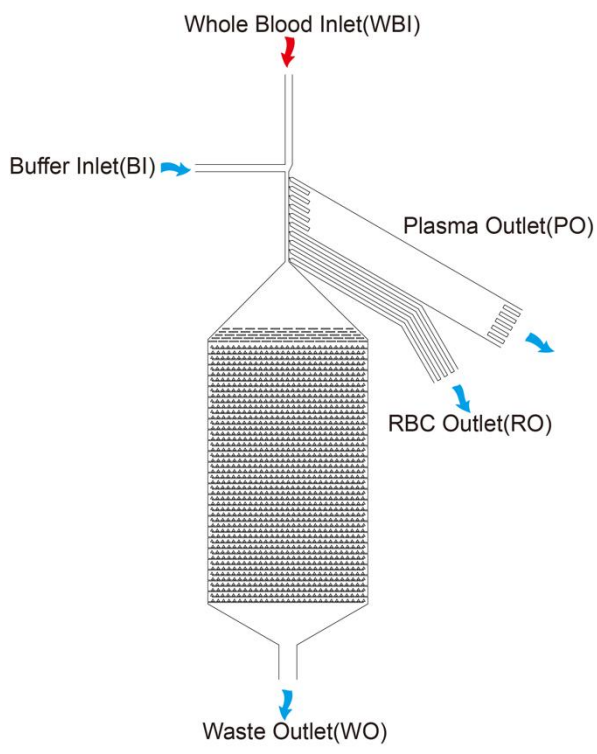


圖 4-5 全血處理微流道晶片出入口示意圖

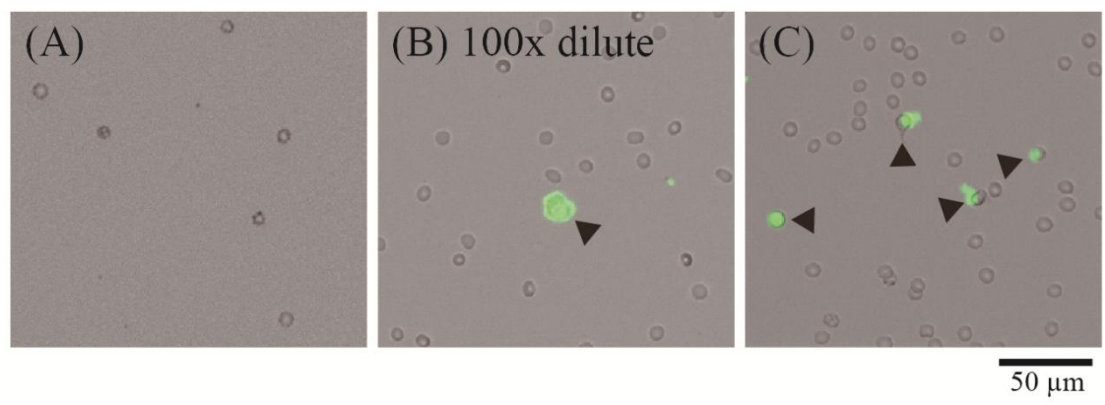


圖 4-6 三個出口所收集之血球影像，分別為(A)PO、(B)RO(100 倍稀釋)、(C)WO，圖中黑色箭號標示處為白血球

在實際上的實驗過程中，發現實際流入微流道晶片之血液樣本的體積比設定上來得少，推測有以下幾個原因：(1)鞘流做為驅動力的緣故，在流道中形成較大之

壓力，使得在流道內之實際流速較設定之流速慢。(2)部分血液樣本停留在流道入口處，尚未往下流至分離流道。(3)實驗的時間太長導致在針筒中的血球已經沉降，高濃度的血球使得針筒難以被推擠，流速下降。另一方面根據實驗即時顯微鏡影像發現白血球容易被分離流道的入口處結構卡住，進而影響鞘流流線，使原本不會通過的白血球細胞被推進分離流道中，並漸漸累積形成堵塞，甚至有可能因此被擠破，如圖 4-7 所示。本實驗證明了本論文所設計之分離流道能達到高效率的紅血球分離，使本微流道具有補捉高純度的白血球細胞之潛力。

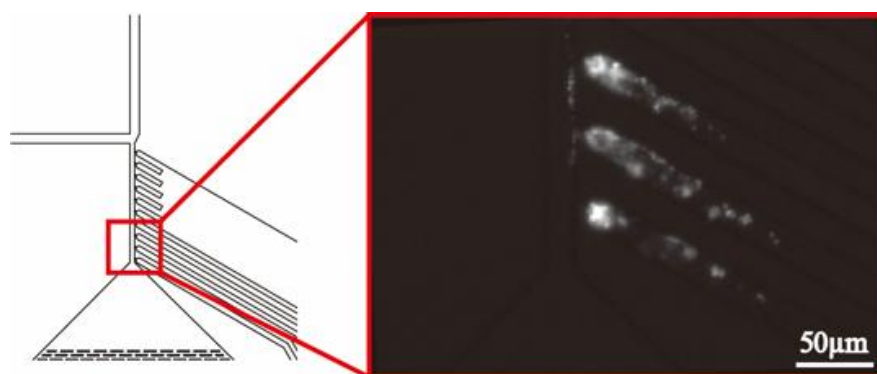


圖 4-7 白血球在分離流道累積形成堵塞

4.5 使用微柱結構捕捉白血球

4.5.1 之字形捕捉區域捕捉白血球

為了計算之字形捕捉區域及圓形捕捉區域捕捉白血球情況，在實驗上使用倒立式螢光顯微鏡及 CCD 即時記錄微流道捕捉白血球的螢光影像。圖 4-8 及圖 4-9 分別為之字形捕捉區域根據流入的血液體積捕捉白血球之實際情況及數量計算，本論文雖然以之字形的設計方式排列捕捉微柱，但實際上白血球並沒有如預期順著之字形流線流動，因此根據觀察白血球之螢光影像的分佈趨勢，將此次實驗分成三個階段的捕捉趨勢以及將捕捉區域分成六個區域。第一階段為流入血液樣本體積至 4.5 μ L，由於本流道是以鞘流做為驅動力，流入之白血球會偏向一側，因此在

此階段的白血球將順著編號從第一區開始被捕捉，照著編號累積到第六區，且呈現一線性增加趨勢；第二階段為流入體積累積至 6 μ L，據觀察此階段在第五區及第六區的白血球因新流入之白血球被推掉，另一方面在第一區跟第二區則是開始有明顯的堵塞，流入與流失的血球數量大致達平衡，數量上的變化不大；到了第三階段則是流入體積累積至 10.5 μ L，此階段第一區跟第二區的白血球的大量堵塞導致捕捉的血球數量再次上升，如圖 4-10 所示，本次實驗捕捉到約 3000 顆白血球。

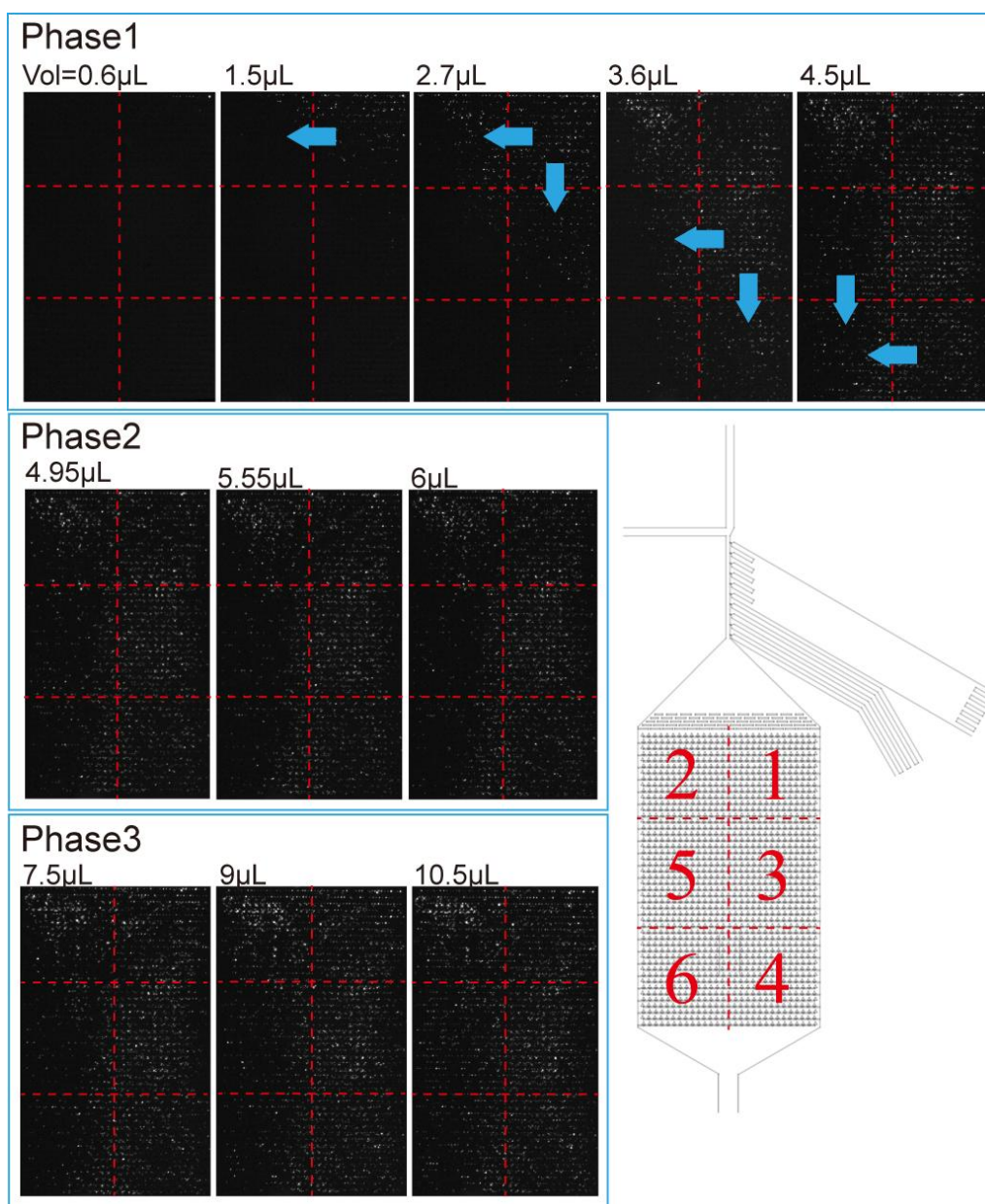


圖 4-8 之字形捕捉區域捕捉情形

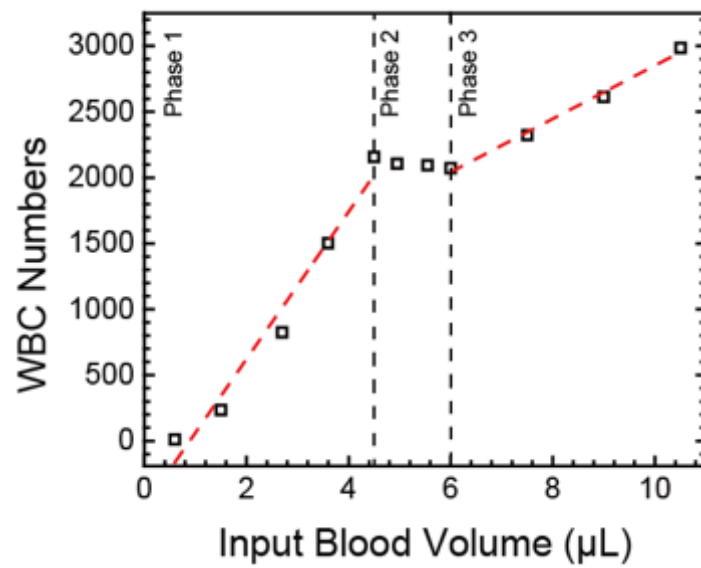


圖 4-9 之字形捕捉區域流入血液樣本體積與白血球計數

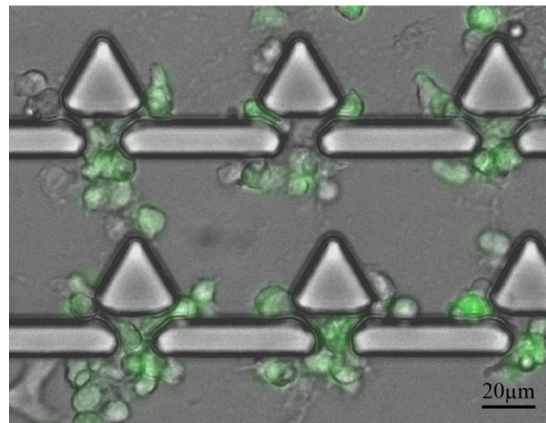



圖 4-10 白血球堵塞影像

4.5.2 圓形捕捉區域捕捉白血球

圖 4-11 及圖 4-12 則分別是圓形捕捉區域捕捉白血球之實際情況及數量計算，同樣地將捕捉趨勢分成三個階段，捕捉區域亦分成六個區域。第一階段為流入血液樣本體積至 1.2 μ L，此階段的白血球將順著編號從第一區開始捕捉，並累積至第四區，此階段；第二階段為流入體積累積至 2.7 μ L，此階段由於第三區及第四區鄰接流道出口，相較於其他四區流速較快，白血球更容易穿過微柱，因此導致捕捉效率開始下降；第三階段則是流入體積累積至 6 μ L，由於第三區及第四區之捕捉趨近飽



和，開始累積至第五區及第六區，並且捕捉效率不再下降。然而與之字形捕捉區域不同，圓形捕捉區域之微柱結構為圓形結構，因此未有白血球在微柱間堵塞的情況，在流入 6 μ L 血液樣本後，被捕捉的白血球數量不在增加，部分新流入之白血球將原本被捕捉之白血球擠掉，而其餘的白血球則是從每一圈微柱較大的間距處流掉。

本實驗藉由螢光顯微鏡的錄影影像說明了本論文設計之兩種捕捉微柱結構皆能夠捕捉從全血分離出來的白血球，然而之字形捕捉區域並沒有如預期讓白血球順利沿之字形的流線移動，導致部分捕捉到的白血球被後來流入之白血球給推掉。另一方面，圓形捕捉區域則是因為圓形的結構導致沒辦法留下更多的白血球。因此未來改進的部分，將以之字形捕捉區域之微柱結構設計為主，並縮短捕捉區域的寬度，或是設計不同的陣列排列方式，藉此改善上述問題。

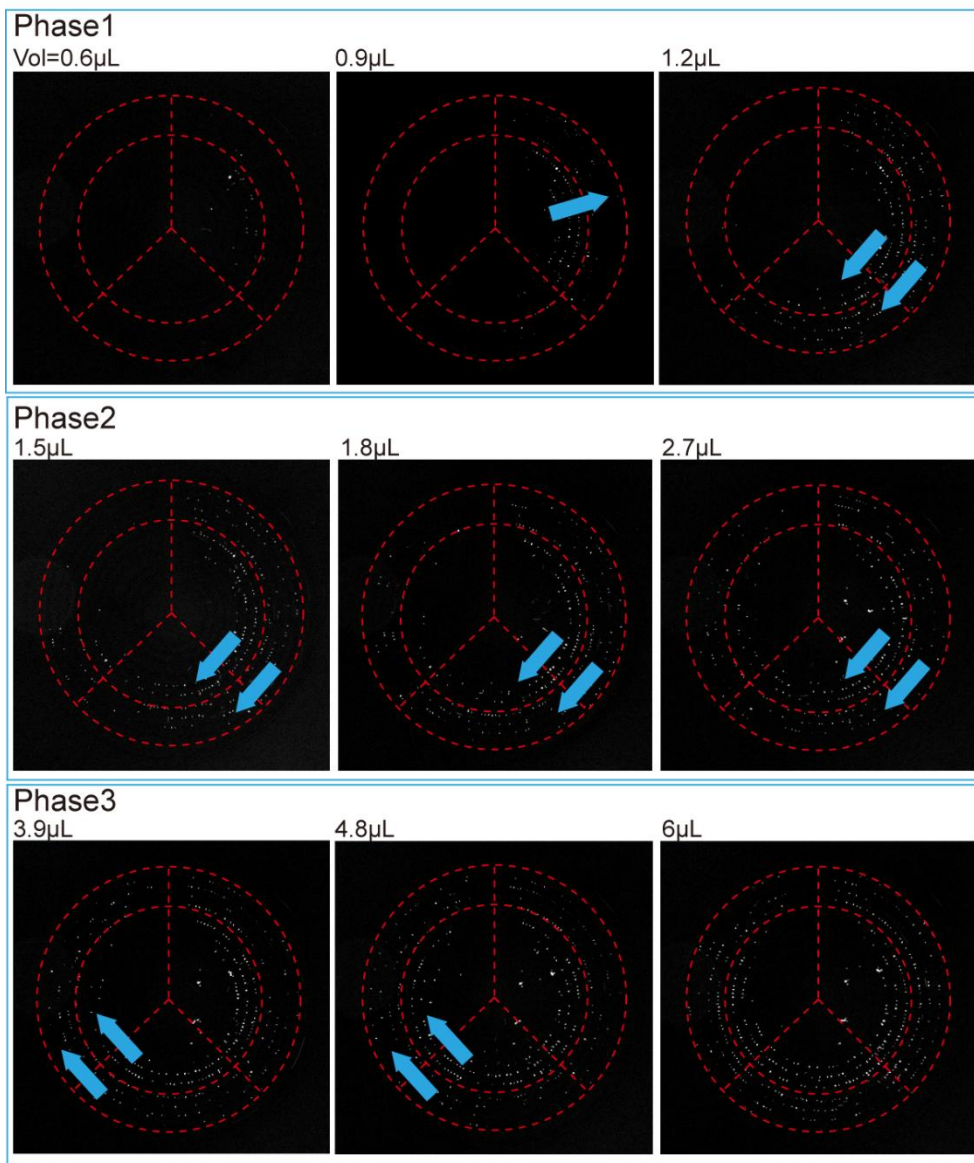
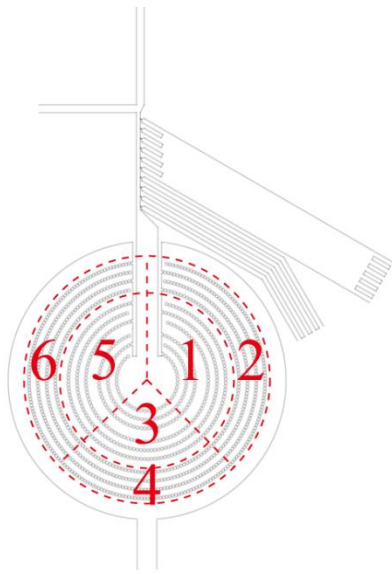


圖 4-11 圓形捕捉區域捕捉情形

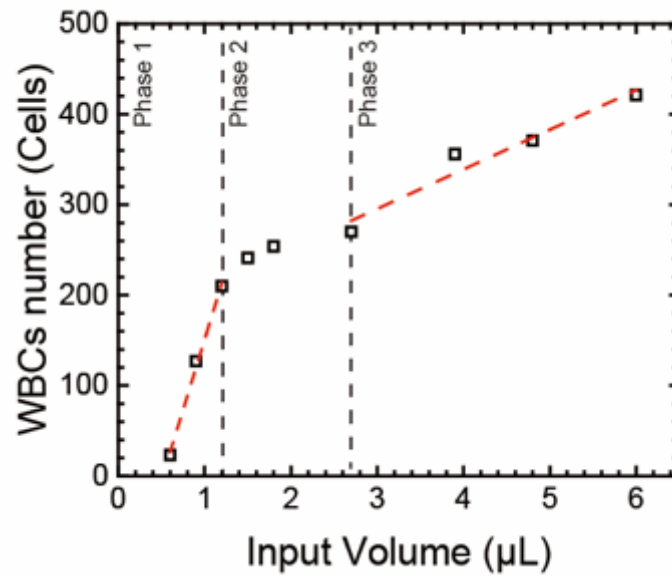


圖 4-12 圓形捕捉區域流入血液樣本體積與白血球計數

4.6 圓形微柱捕捉不同尺寸之微珠

為了進一步地將白血球分類，以實現全血細胞計數(CBC)的功能，本實驗以 $4.5\mu\text{m}$ 微珠以及 $10\mu\text{m}$ 微珠進行模擬捕捉白血球及較大顆的罕見細胞分佈測試，圖 4-13(A)為只流入 $4.5\mu\text{m}$ 微珠溶液之捕捉影像；圖 4-13(B) 為只流入 $10\mu\text{m}$ 微珠溶液之捕捉影像，這兩張影像說明了圓形捕捉區域能夠個別地兩種微珠；而圖 4-13(C) 則是流入 $4.5\mu\text{m}$ 及 $10\mu\text{m}$ 微珠混合溶液之捕捉影像，從影像上發現 $10\mu\text{m}$ 微珠只有被第四圈以內微柱結構捕捉，而 $4.5\mu\text{m}$ 微珠則是被最外面的四圈微柱結構所捕捉，這說明了圓形捕捉區域也能將兩種不同尺寸的混合微珠進行分類捕捉，使本微流道晶片具有捕捉血液中稀少細胞的可能性。

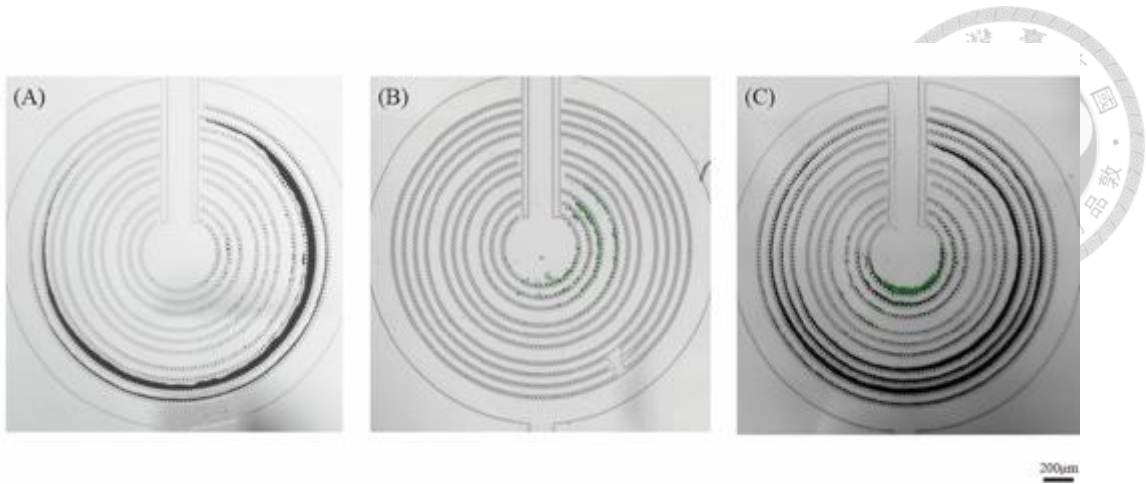


圖 4-13 圓形捕捉區域捕捉(A)4.5 μm 微珠(B)10 μm 微珠(C)4.5 μm 及 10 μm 微珠。

第 5 章 結論與未來展望



5.1 結論

本論文設計一全血處理微流道晶片，以被動式的分離技術，在無需標記血球細胞的情況下，將血漿、紅血球、白血球同時分離，並將分離後之白血球以微柱結構進行捕捉。本論文以不同的分離目標設計了與之相應的實驗，目前血漿分離微流道的設計能從全血中分離出稀釋倍率為 1.3 至 2.5 倍的純化血漿(所含血球濃度約為原血液血球濃度的 0.25%)。在分離血球的部分，由於在微流道設計上與實際的製程結果有誤差，導致大部分的紅血球及白血球都通過分離流道。

在白血球捕捉的部分，以 Calcein-AM 螢光染劑使被微柱捕捉之白血球能夠進行影像上的計數，之字形捕捉區域能夠從約 10 μ L 之全血中捕捉到約 3000 顆的白血球；而圓形捕捉區域能從約 6 μ L 的全血中捕捉到約 500 顆白血球，捕捉效率遠低於之字形捕捉區域，且已經達到能捕捉的上限，但透過分類捕捉大小微珠的實驗，說說明此捕捉流道設計可應用於捕捉或分類稀少細胞的測試。

根據血漿分離實驗及捕捉白血球實驗的結果，說明本論文之全血處理微流道晶片在以微量(5-10 μ L)的血液體積樣本下，已經能有初步的處理結果，並且使全血細胞計數(CBC)在未來能夠發展應在於實驗室晶片(POC)上。

5.2 未來展望

本論文在微流道晶片上進行全血的血漿分離、血球分離，以及白血球捕捉已經有初步的成果，仍有部分目標不如預期，故以下將對未來可持續改進的部分做詳細的說明：

1. 由於本論文設計之分離流道具有夾角結構，在實際製程的結果上，這些稜角



結構會產生導角的效果，夾角的地方會變得較圓鈍，導致分離流道的分離效果不如預期。因此在未來新的微流道設計畫圖檔時需將導角的問題考慮進去，使導角的效果抵消以解決此問題。

2. 在實驗的過程中，一直為雜質流入流道使得流道卡死的問題所困擾，雜質來源來自於 Pluronic 溶液以及病人的血液，因此須在流道的入口處增加過濾雜質的微柱結構，避免雜質導致實驗失敗。另一部分，在流道入口針頭的部分加入磁珠攪拌器或振盪器，讓實驗中的血液能保持全血的狀態。
3. 本論文所設計之之字形捕捉微區域之捕捉效率量測並未最佳化，在未來將縮短捕捉區域的左右寬度，或以不同的排列方式排列微柱。此外增加樣本實驗的數據後，預期能夠輕易地從捕捉到白血球的微柱數量，甚至只需觀察捕捉區域，就可以得知捕捉到的白血球數量。
4. 目前的全血處理微流道晶片仍是在實驗室的環境下進行，且其操作需經過專業訓練，未來希望能夠將其應用在定點照護。故能加快具體實現的方式有：未來以新的微流道設計進行目前已有的實驗來驗證其表現、簡化整個處理流程使每個人都能輕易使用、提高微流道表現得一致性以降低人為的誤差。

文獻回顧

1. Marchington, R.F., et al., *Optical injection of mammalian cells using a microfluidic platform*. Biomedical Optics Express, 2010. **1**(2): p. 527-536.
2. Tung, Y.-C., et al., *Optofluidic Detection for Cellular Phenotyping*. Lab on a chip, 2012. **12**(19): p. 10.1039/c2lc40509a.
3. Quinto-Su, P.A., et al., *Examination of laser microbeam cell lysis in a PDMS microfluidic channel using time-resolved imaging*. Lab on a Chip, 2008. **8**(3): p. 408-414.
4. Huang, N.-T., et al., *An integrated microfluidic platform for in situ cellular cytokine secretion immunophenotyping*. Lab on a Chip, 2012. **12**(20): p. 4093-4101.
5. Huang, N.-T., et al., *Recent advancements in optofluidics-based single-cell analysis: optical on-chip cellular manipulation, treatment, and property detection*. Lab on a Chip, 2014. **14**(7): p. 1230-1245.
6. Oh, B.-R., et al., *Integrated Nanoplasmonic Sensing for Cellular Functional Immunoanalysis Using Human Blood*. ACS Nano, 2014. **8**(3): p. 2667-2676.
7. Huang, C.-W., et al., *A CMOS wireless biomolecular sensing system-on-chip based on polysilicon nanowire technology*. Lab on a Chip, 2013. **13**(22): p. 4451-4459.
8. Kuan, D.-H., et al., *A microfluidic device integrating dual CMOS polysilicon nanowire sensors for on-chip whole blood processing and simultaneous detection of multiple analytes*. Lab on a Chip, 2016. **16**(16): p. 3105-3113.
9. Pei-Wen, Y., et al., *A device design of an integrated CMOS poly-silicon biosensor-on-chip to enhance performance of biomolecular analytes in serum samples*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **61**: p. 112-118.
10. Jiang, Y., et al., *Integrated Plastic Microfluidic Devices with ESI-MS for Drug Screening and Residue Analysis*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(9): p. 2048-2053.
11. Prabhakar, A., et al., *A novel, compact and efficient microchannel arrangement with multiple hydrodynamic effects for blood plasma separation*. Microfluidics and Nanofluidics, 2015. **18**(5): p. 995-1006.
12. Marchalot, J., Y. Fouillet, and J.-L. Achard, *Multi-step microfluidic system for blood plasma separation: architecture and separation efficiency*. Microfluidics and Nanofluidics, 2014. **17**(1): p. 167-180.
13. Sollier, E., et al., *Fast and continuous plasma extraction from whole human blood based on expanding cell-free layer devices*. Biomedical microdevices, 2010. **12**(3): p. 485-497.
14. Siddhartha, T., et al., *Passive blood plasma separation at the microscale: a review of design principles and microdevices*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2015. **25**(8): p. 083001.
15. Kersaudy-Kerhoas, M. and E. Sollier, *Micro-scale blood plasma separation: from acoustophoresis to egg-beaters*. Lab on a Chip, 2013. **13**(17): p. 3323-3346.
16. Dimov, I.K., et al., *Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS)*. Lab on a chip, 2011. **11**(5): p. 845-850.
17. Son, J.H., et al., *Hemolysis-free blood plasma separation*. Lab on a Chip, 2014. **14**(13): p. 2287-2292.
18. Zhang, X.-B.B., et al., *Gravitational sedimentation induced blood delamination for continuous plasma separation on a microfluidics chip*. Analytical chemistry,

- 
2012. **84**(8): p. 3780-3786.
19. Haeberle, S., et al., *Centrifugal extraction of plasma from whole blood on a rotating disk*. Lab on a Chip, 2006. **6**(6): p. 776-781.
 20. Kim, B., et al., *Microfluidic Pipette Tip for High-Purity and High-Throughput Blood Plasma Separation from Whole Blood*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(3): p. 1439-1444.
 21. Lenshof, A. and T. Laurell, *Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(3): p. 1203-1217.
 22. Bhagat, A.A.S., et al., *Microfluidics for cell separation*. Medical & Biological Engineering & Computing, 2010. **48**(10): p. 999-1014.
 23. Inglis, D.W., et al., *Microfluidic high gradient magnetic cell separation*. Journal of Applied Physics, 2006. **99**(8): p. 08K101.
 24. MacDonald, M.P., G.C. Spalding, and K. Dholakia, *Microfluidic sorting in an optical lattice*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 421-424.
 25. Pamme, N., *Continuous flow separations in microfluidic devices*. Lab on a Chip, 2007. **7**(12): p. 1644-1659.
 26. Park, J.-S., S.-H. Song, and H.-I. Jung, *Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels*. Lab on a Chip, 2009. **9**(7): p. 939-948.
 27. Wu, Z., et al., *Continuous inertial microparticle and blood cell separation in straight channels with local microstructures*. Lab on a Chip, 2016. **16**(3): p. 532-542.
 28. Hur, S.C., H.T.K. Tse, and D. Di Carlo, *Sheathless inertial cell ordering for extreme throughput flow cytometry*. Lab on a Chip, 2010. **10**(3): p. 274-280.
 29. Wu, R.G., et al. *Label-free blood cells separation and enrichment from whole blood by high-throughput hydrodynamic and inertial force*. in *2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII)*. 2013.
 30. Tseng, H.C., et al. *High-throughput white blood cells (leukocytes) separation and enrichment from whole blood by hydrodynamic and inertial force*. in *2012 IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*. 2012.
 31. Hyun, K.-A., et al., *Microfluidic flow fractionation device for label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) from breast cancer patients*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **40**(1): p. 206-212.
 32. Gossett, D.R., et al., *Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(8): p. 3249-3267.
 33. Chen, X., et al., *Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification*. Analytica Chimica Acta, 2007. **584**(2): p. 237-243.
 34. Chen, X., et al., *Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on crossflow filtration*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2008. **130**(1): p. 216-221.
 35. VanDelinder, V. and A. Groisman, *Perfusion in Microfluidic Cross-Flow: Separation of White Blood Cells from Whole Blood and Exchange of Medium in a Continuous Flow*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(5): p. 2023-2030.
 36. Sajeesh, P., et al., *A microfluidic device with focusing and spacing control for resistance-based sorting of droplets and cells*. Lab on a Chip, 2015. **15**(18): p. 3738-3748.
 37. Lee, M.G., et al., *Label-Free Cancer Cell Separation from Human Whole Blood*

- Using Inertial Microfluidics at Low Shear Stress*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(13): p. 6213-6218.
38. Choi, J., J.-c. Hyun, and S. Yang, *On-chip Extraction of Intracellular Molecules in White Blood Cells from Whole Blood*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 15167.
39. Johnston, I.D., et al., *Dean flow focusing and separation of small microspheres within a narrow size range*. Microfluidics and Nanofluidics, 2014. **17**(3): p. 509-518.
40. Yoon, Y., et al., *Clogging-free microfluidics for continuous size-based separation of microparticles*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 26531.
41. Alvankarian, J., A. Bahadorimehr, and B. Yeop Majlis, *A pillar-based microfilter for isolation of white blood cells on elastomeric substrate*. Biomicrofluidics, 2013. **7**(1): p. 014102.
42. Chen, J., et al., *Microfluidic chips for cells capture using 3-D hydrodynamic structure array*. Microsystem Technologies, 2014. **20**(3): p. 485-491.
43. Dhar, M., et al., *High efficiency vortex trapping of circulating tumor cells*. Biomicrofluidics, 2015. **9**(6): p. 064116.
44. Chen, J., et al., *A microfluidic chip for direct and rapid trapping of white blood cells from whole blood*. Biomicrofluidics, 2013. **7**(3): p. 034106.
45. Sarioglu, A.F., et al., *A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters*. Nat Meth, 2015. **12**(7): p. 685-691.
46. Albert, J.M., B.A. Oladunni, and C. Dino Di, *Microfluidic sample preparation for diagnostic cytopathology*. Lab on a chip, 2013. **13**(6): p. 1011-1026.
47. Yang, S., A. Undar, and J.D. Zahn, *A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation*. Lab on a Chip, 2006. **6**(7): p. 871-880.
48. Yen, R.T. and Y.C. Fung, *Effect of velocity distribution on red cell distribution in capillary blood vessels*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 1978. **235**(2): p. H251.
49. Kim, M., et al., *A Microfluidic Device for Continuous White Blood Cell Separation and Lysis From Whole Blood*. Artificial Organs, 2010. **34**(11): p. 996-1002.
50. Ji, H.M., et al., *Silicon-based microfilters for whole blood cell separation*. Biomedical Microdevices, 2008. **10**(2): p. 251-257.
51. Li, C., et al., *Extraction of plasma from whole blood using a deposited microbead plug (DMBP) in a capillary-driven microfluidic device*. Biomedical Microdevices, 2012. **14**(3): p. 565-572.